

Aus dem Institut für Arbeits-, Sozial-, und Umweltmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Hallier)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***In-vitro*-Untersuchung der Zytotoxizität
der synthetischen Nanomaterialien
Kohlenstoffnanohörner und
CdSe/CdS-Nanostäbchen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nora Dagmar Friederike Heike Hoberg

aus

Hannover

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in: Univ.-Prof. Dr. med. A. Heutelbeck
Ko-Referent/in:
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*In-vitro*-Untersuchung der Zytotoxizität der synthetischen Nanomaterialien Kohlenstoffnanohörner und CdSe/CdS-Nanostäbchen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 16.12.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Schramm F, Lange M, Hallier E, Hoppmann P, **Hoberg N**, Heutelbeck A (2014): Kohlenstoffnanohorns (CNH) in einer zytotoxischen Untersuchung an humanen Alveolarepithelzellen; In: Dokumentation der 54. Jahrestagung der DGAUM 2014; 449–452

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Strukturen von Nanomaterial.....	4
1.2 Kohlenstoffnanohörner	6
1.3 CdSe/CdS-NaSt.....	8
1.4 Ablagerung von Nanopartikeln in den Atemwegen	9
1.5 Reinigungsmechanismen der Atemwege bei Nanopartikeln	10
1.6 Zelluläre Interaktionen von Nanopartikeln	11
1.7 Toxikologische Eigenschaften von Nanopartikeln.....	11
1.8 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Nanomaterialproben	13
2.1.2 Zelllinien	14
2.1.4 Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits	17
2.1.5 Farbstoffe.....	18
2.1.6 Lösungen, Puffer und Zellkultur-/Medien	18
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.8 Technische Geräte und Hilfsmittel	23
2.1.9 Mikroskopie.....	25
2.1.10 Software	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Versuchsaufbau.....	31
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Vorversuche	40
3.1.1 Lösungsmiteleinfluss	40
3.1.2 Einfluss des pH-Wertes.....	43
3.1.3 Wachstumskurve	45
3.1.4 Ligandeneinfluss	47
3.2 Hauptversuche	50
3.2.1 CNH-A.....	51
3.2.2 CNH-B.....	54
3.2.3 CdSe/CdS-NaSt.....	57

4	Diskussion.....	61
4.1	Toxizität der CNH	61
4.2	Toxizität von CdSe/CdS-NaSt.....	63
4.3	Toxizitätsvergleich der Nanomaterialien hinsichtlich ihrer Größe	66
4.4	Vergleich der Zelliniensensitivität.....	68
4.4.1	Abhängigkeit zu CNH-A/-B.....	68
4.4.2	Abhängigkeit zu CdSe/CdS-NaSt.....	68
4.4.3	Abhängigkeit zu Zellinieneigenschaften.....	69
4.5	Ausblick.....	69
5	Zusammenfassung.....	71
6	Anhang	72
7	Literaturverzeichnis	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beziehungen zwischen Primärpartikel, Agglomerat und Aggregat.	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur CNT und CNH.	6
Abbildung 3: Schematisches CNH-Kristallgittermodell.	7
Abbildung 4: Querschnitt eines CdSe/CdS-NaSt-Modells.....	8
Abbildung 5: NCI-H322-Zellen.....	14
Abbildung 6: A-549-Zelle.....	15
Abbildung 7: Ergebnis der PCR vom 2013-10-22.	30
Abbildung 8: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest bei der Zelllinie NCI-H322 in Abhängigkeit zur DMSO-Volumenkonzentrationen [% v/v].....	41
Abbildung 9: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest bei der Zelllinie A-549 in Abhängigkeit zur DMSO-Volumenkonzentrationen [% v/v].....	42
Abbildung 10: Vergleich der MW der optischen Dichte von NK und NK-pH im Neutralrottest und WST-1-Test.	44
Abbildung 11: Wachstumskurve der Zelllinie NCI-H322.	45
Abbildung 12: Wachstumskurve der Zelllinie A-549.....	46
Abbildung 13: Zellvitalität [%] im Neutralrottest und mitochondriale Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].	47
Abbildung 14: Zellvitalität [%] im Neutralrottest und mitochondriale Aktivität [%] im WST-1- Test in Abhängigkeit zur Liganden MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].....	49
Abbildung 15: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CNH-A- Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].	52
Abbildung 16: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].	53
Abbildung 17: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CNH-B- Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].	55
Abbildung 18: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].....	56
Abbildung 19: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt- Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].	58
Abbildung 20: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits	17
Tabelle 2: Farbstoffe und deren Hersteller.....	18
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte	23
Tabelle 5: CNH-Verdünnungsreihe.....	33
Tabelle 6: Verdünnungsreihe der CdSe/CdS-NaSt vom 2014-12-04	34
Tabelle 7: Verdünnungsreihe des Liganden MPA vom 2014-06-16	35
Tabelle 8: Mikrotiterplattenbelegung im WST-1-Test am Beispiel CNH	36
Tabelle 9: Mikrotiterplattenbelegung zur Untersuchung der Liganden MPA und MeOH	37
Tabelle 10: Bewertung der Hemmung und Einstufung der Zytotoxizität	38
Tabelle 11: Tests mit Nanomaterial CNH-A	51
Tabelle 12: Tests mit Nanomaterial CNH-B.....	54
Tabelle 13: Tests mit Nanomaterial CdSe/CdS-NaSt	57

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden, sofern diese sinnvoll und vorhanden waren, deutsche Fachbegriffe verwendet. Falls geeignete deutsche Fachbegriffe nicht verwendet werden konnten oder keine eindeutige Bezeichnung wiedergaben, wurden englische Fachbegriffe genutzt. Fremdsprachliche Begriffe wurden durch kursive Schreibweise kenntlich gemacht. Handelsnamen bzw. Warenzeichen wurden in dieser Arbeit nicht gesondert gekennzeichnet. Einheiten wurden nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) angegeben.

CdSe/CdS-NaSt CdSe/CdS-Nanostäbchen, Cadmiumselenid/Cadmiumsulfid-Nanostäbchen

CNH	Kohlenstoffnanohörner, <i>carbon nano horns</i>
CNT	Kohlenstoffnanoröhren, <i>carbon nano tubes</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS), <i>desoxyribonucleotid acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
MEK	Methylethylketon
MW	Mittelwert(e)
MPA	3-Mercaptopropionsäure
NK	Negativkontrolle(n)
OD	optische Dichte
p. A.	besonders reine Chemikalien, <i>pro analysi</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin-Antibiotikallösung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negative dekadische Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration, <i>potentia hydrogenii</i>
PK	Positivkontrolle
QD	Quantenpunkt, <i>quantum dot</i>
SP	Oberflächenprotein, Surfactant-Protein, <i>surfactant protein</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, World Health Organization
WST-1	wasserlösliches Tetrazoliumsalz-1, <i>water solubel tetrazolium salt-1</i>

1 Einleitung

Stoffe, die sich zu mindestens 50 % aus Partikeln mit Außenmaßen im Bereich 1 – 100 nm zusammensetzen, werden als Nanomaterial bezeichnet (ISO/TS 80004-1 2015).

Nanopartikel besitzen ein anderes physikalisches und chemisches Verhalten im Vergleich zu makroskopischen Werkstoffen, bedingt durch ihre viel größere spezifische Oberfläche (größere Oberfläche pro Masse bzw. zum Volumen) (Wegner und Pratsinis 2004; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Mit abnehmendem Partikeldurchmesser steigt der Anteil an Oberflächenatomen im Verhältnis zur Oberfläche an, sodass ein exponentieller Anstieg bei Partikeldurchmessern unter 100 nm zu vermerken ist (Köhler 2004; Oberdörster et al. 2005). Dadurch nimmt die Oberflächenenergie im Vergleich zur Gesamtenergie der Nanopartikel zu (Köhler 2004; Walter 2013). Nanopartikel zeigen daher eine höhere chemische Reaktivität, wobei sie bei Maßen unter 50 nm zudem gleichzeitig der Quantenphysik unterliegen (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Zusätzlich kann auch die biologische Wirksamkeit in Form einer höheren Biopersistenz oder höheren biologische Aktivität verändert sein. Daraus resultiert, dass Nanopartikel keine gültigen Eigenschaften für alle Stoffgruppen aufzeigen (Wegner und Pratsinis 2004; Grigat et al. 2013). Diese Eigenschaften werden durch Partikelgröße und -form beeinflusst (Salomon 2009), wobei auch die spezifische Oberfläche pro Masseneinheit bei gleichbleibender Oberflächen- und Ausgangsmaterialchemie (*bulk chemistry*) von toxikologischer Relevanz ist (Oberdörster et al. 2005). Aufgrund der besonderen chemischen Eigenschaften werden Festigkeit und physikalische Eigenschaften des Materials beeinflusst. Die besonderen physikalischen Eigenschaften führen zu veränderten optischen, elektrischen und magnetischen Eigenschaften. Die Materialien haben eine höhere Dichte und Widerstandsfähigkeit, veränderte Löslichkeit, Transparenz, Farbe, Absorptionsfähigkeit, elektrische Leitfähigkeit bzw. veränderten elektrischen Widerstand (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013).

Nanomaterialien werden entsprechend ihrer Entstehung in natürliche und synthetische Nanomaterialien untergliedert (Grigat et al. 2013). Natürliche Nanomaterialien können durch natürliche Prozesse, wie beispielsweise Verwitterungsprozesse, Vulkanausbrüche und biologische Prozesse, entstehen. Ebenfalls können Nanomaterialien unbeabsichtigt bei der unvollständigen Verbrennung fossiler Kraftstoffe oder als Reifenabrieb im Straßenverkehr, sowie in gewerblichen und industriellen Produktionsprozessen als Nebenprodukt, Schadstoff oder Abfall entstehen (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Bei einer gezielten Herstellung mit klar definierter Struktur und Zusammensetzung durch wirtschaftliche Anlagenprozesse handelt es sich um synthetische Nanomaterialien (Europäische Kommission 2011; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Dazu gehören u. a. Kohlenstoff-Nanomaterialien und Halbleiternanokristalle (Quantenpunkte, QD). Zu den Kohlenstoff-Nanomaterialien zählen u. a. Kohlenstoffnanoröhren (CNT,

carbon nano tubes), Industrieruß (*carbon black*) (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013) und Kohlenstoffnanohörner (CNH, *carbon nano horns*).

Anwendungsgebiete der Kohlenstoff-Nanomaterialien liegen beispielsweise bei der Sorption organischer Schadstoffe, in der Luft-, Raumfahrt- und Automobilindustrie, als Füllstoff in der Gummiindustrie oder dem UV-Schutz von Kunststoffen. Cadmiumselenid/Cadmiumsulfid-Nanostäbchen (CdSe/CdS-NaSt) zählen zu den QD-Nanomaterialien, die u. a. in Solarzellen oder in Leuchtdioden und in der Medizintechnik angewendet werden (Grigat et al. 2013). Die verschiedenen Nanomaterialien haben darüber hinaus vielfältige Einsatzgebiete.

Das im Laufe des letzten Jahrhunderts rasant aufkeimende Gebiet der Nanotechnologie bietet heute einen eigenen Forschungsbereich, der vom aktuellen Markt kaum noch wegzudenken ist. Nanotechnologie erlaubt es Materialien mit neuen oder optimierten Funktionen auszustatten, die in allen naturwissenschaftlichen und technischen Disziplinen Anwendung finden können und beeinflusst hierdurch die Wettbewerbsfähigkeit vieler Unternehmen (Wagner et al. 2006; Mittmann-Frank et al. 2009; Aaron et al. 2011; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). All dies führt seitens der Industrie zu einem erheblichen Interesse, sodass sowohl die Produktvielfalt als auch die Produktionsmengen von synthetischen Nanomaterialien rasant gestiegen sind und diese nun auch in Gebrauchsgütern verstärkt Einzug finden (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013).

Diese Verbreitung birgt auch die Möglichkeit, dass Menschen einer Exposition mit freien synthetischen Nanopartikeln ausgesetzt sind (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Gerade weil bereits sehr geringe Mengen von Nanomaterialien in der Luft sehr hohe Konzentrationen dieser Teilchen enthalten (Oberdörster et al. 2005), führt die vermutlich für den Menschen gefährlichste Exposition über die Atemwege (Oberdörster et al. 2005; Mittmann-Frank et al. 2009; Salomon 2009; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Ma-Hock et al. 2014).

Die menschliche Lunge ist relevante Kontaktfläche zur Umwelt und dient als Eintragspfad. Die Gasaustauschfläche beträgt bei forcierter maximaler Inspiration 140 m² (Aumüller et al. 2007, S. 533 f.). Nanomaterialien können sich in allen Lungenbereichen ablagern (Grigat et al. 2013). Bedingt durch ihre geringe Größe steigt mit abnehmender Partikelfraktion die Depositionsrate von Nanomaterialien in den distalen Atemwegen, wo sie durch ihre hohe Biobeständigkeit mitunter lebenslang persistieren (Oberdörster et al. 1994; Kreyling und Scheuch 2000; Salomon 2009). Die Partikelklasse der ultrafeinen Partikel mit einem Partikeldurchmesser unter 0,1 µm gelangt bis in die Alveolen (Oberdörster et al. 2005; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Zu dieser Partikelklasse werden auch die synthetischen Nanomaterialien gerechnet (Grigat et al. 2013).

Die Auswirkungen von Nanomaterialien auf den Menschen sind noch unzureichend bekannt (Oberdörster et al. 2005; Choi et al. 2009; Loginova et al. 2012). Erste Erkenntnisse zeigen nachteilige Effekte im Respirationstrakt aber auch im kardiovaskulärem System und zentralem

Nervensystem (Mittmann-Frank et al. 2009). Es fehlen genaue Informationen bezüglich der Sicherheit und der Wirkung auf den Organismus, sowie möglicher Gefahren der einzelnen Nanopartikel (Oberdörster et al. 2005; Salomon 2009).

Von inhalierbaren, nicht oder kaum löslichen, freien Nanopartikeln, Nanoröhren und Nanofasern, sowie deren Aggregaten und Agglomeraten gehen höhere Gesundheitsrisiken (Mittmann-Frank et al. 2009; Salomon 2009; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012) als von biologisch abbaubaren Nanomaterialien oder deren festgelegten Formen aus (Grigat et al. 2013). CNT riefen in Lungen von Nagetieren Entzündungsreaktionen, Granulombildungen, Lungenfibrose und Mesotheliome hervor, ähnlich wie auch Asbestfasern (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Grigat et al. 2013). Die Asbestfaserwirkung beruht auf der hohen Biopersistenz und der Fasergeometrie, die auch CNT inne haben (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). Auch CNH und Nanostäbchen (*nanorods*) sind strukturähnlich zu den in vielen Arbeiten verwendeten röhrenförmigen CNT (Lam et al. 2004; Miyawaki et al. 2008; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). Die Inhalationstoxizität von Faserstäuben, wie von der WHO definiert, die bis in die tiefen Atemwege vordringen können, beruht auf ihrer kritischen Fasergeometrie, ihrer hohen Biopersistenz und weiteren Faktoren wie bei der Asbestfaser die Elementarfibrillenaufspaltung. Als kritische Fasergeometrie gilt eine Länge über 5 µm, ein Durchmesser unter 3 µm und ein Längen-Durchmesser-Verhältnis größer gleich 3 : 1 (Oberdörster et al. 2005; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012).

Auf Grund der steigenden Verbreitung und den wachsenden Anwendungsfällen von Nanomaterialien bekommt bei den gestiegenen Produktionsmengen und den von größeren Materialien abweichenden Eigenschaften, die gesonderte Betrachtung von Nanomaterialien im Arbeitsschutz eine immer größere Bedeutung (Salomon 2009). Die Herstellungsverfahren von Nanomaterialien als auch deren Weiterverarbeitung und Anwendung bergen die Gefahr einer Exposition von Arbeitnehmern mit diesen (Mittmann-Frank et al. 2009; Salomon 2009).

Arbeitgeber müssen nach Arbeitsschutzgesetz Sicherheit und Gesundheit ihrer Arbeitnehmer schützen. § 5 schreibt eine Risikobewertung zur Sicherheit und Gesundheitsschutz der Arbeitsplätze vor und § 6 regelt dahingehende Dokumentationspflichten. Es gilt das generische Vorsorgeprinzip, nachdem Arbeitgeber zu angemessener Sicherung der Arbeitsplätze verpflichtet sind. Demgegenüber besteht Ungewissheit über das Risiko synthetischer Nanomaterialien. Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW) helfen Arbeitgebern bei der Risikobewertung und der Wahl angemessener Schutzmaßnahmen und basieren auf arbeitsmedizinischen Erfahrungen und toxikologischen Erkenntnissen. AGW makroskopischer Stoffe sind aufgrund abweichender Eigenschaften nicht auf Nanomaterial anwendbar. Daher sind Untersuchung und Quantifizierung des Risikos durch synthetische Nanomaterialien erforderlich, um Arbeitgebern Rechtssicherheit bei der Wahl geeigneter Maßnahmen zu geben und Arbeitnehmern einheitlich angemessenen Arbeitsschutz zu bieten.

Auf Grund der in Deutschland gültigen EU-REACH-Verordnung, die zur Registrierung, Evaluierung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien dient, existieren seit 01.01.2020

neue Pflichten für Unternehmen, die Nanomaterialien auf den Markt bringen wollen. Die Regelungen umfassen eine spezifische Risikobewertung und angemessene Risikomanagementmaßnahmen vorsehen bei entsprechendem toxikologischem Profil und Expositionsmuster (Europäische Kommission 2018). Bis dahin und darüber hinaus gibt es in Deutschland (BAuA und VCI 2012; Grigat et al. 2013) und nach EU-Recht keine spezifischen Präventiv- und Testpflichten für Nanomaterialien (Grigat et al. 2013).

Im Folgenden wird auf die vorgenannten Aspekte näher eingegangen.

1.1 Strukturen von Nanomaterial

Nanomaterial setzt sich aus Nanostrukturen zusammen. Primäre Partikel besitzen eine genau definierte Geometrie (ISO/TS 80004-2 2015). Setzt sich der Nanopartikel ohne diese definierte Geometrie zusammen, spricht man von *bulk* bzw. *Bulk*-Material. Lagern sich die im ungebundenen Zustand befindlichen primären Partikel durch Adhäsionskräfte wie Van-der-Waals-Kräfte zusammen, bildet sich ein Agglomerat. Über die koordinierte Zusammenlagerung primärer Partikel unter Ausbildung fester Bindungen, beispielsweise kovalenter Bindungen oder Sinterungsprozesse, zu einem neuen größeren Partikel entsteht ein Aggregat (Grigat et al. 2013; Walter 2013; ISO/TS 80004-2 2015).

Bei Aggregaten ist die spezifische Oberfläche kleiner als die Summe aus den Oberflächen all ihrer primären Partikel (Abbildung 1) (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Walter 2013; ISO/TS 80004-2 2015). Aggregate und Agglomerate werden auch als sekundäre Partikel bezeichnet (ISO/TS 80004-2 2015).

Primäre Partikel, Aggregate oder eine Mischung aus beiden (Formen) können durch Agglomeration unter Ausnutzung von Adhäsionskräften ebenfalls größere Einheiten bilden. Agglomerate sind jedoch nicht fest verbundene Einheiten und können durch das Auftreffen auf biologisches Material, eine Veränderung des pH-Wertes, Änderungen der Temperatur oder des Luftdruckes sich neu zusammensetzen. Agglomerate werden makroskopisch als ein Partikel wahrgenommen. Das Verhalten von primären Partikeln Agglomerate zu bilden ist größenabhängig. So nimmt mit Zunahme der Partikelgröße das Agglomerationsbestreben sowie die Löslichkeit der Partikel ab (Walter 2013).

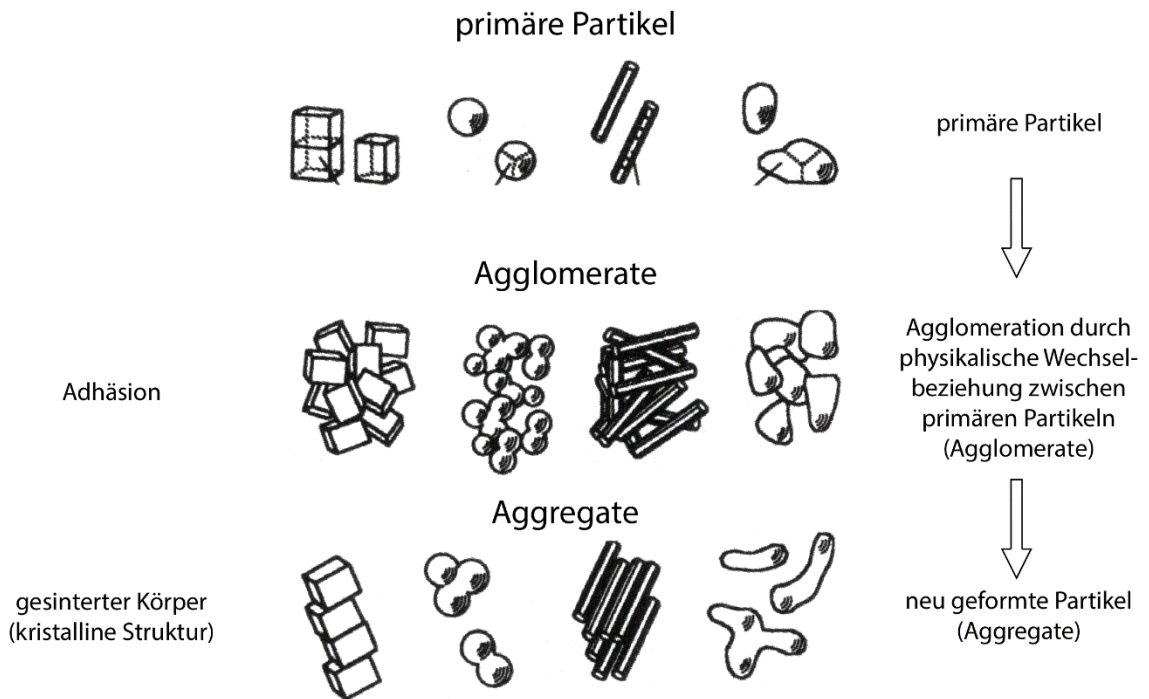


Abbildung 1: Beziehungen zwischen Primärpartikel, Agglomerat und Aggregat. Abgebildet ist die Unterscheidung von Agglomeraten und Aggregaten in den ersten drei Spalten. Die vierte Spalte zeigt Nanopartikel, die als *bulk* bzw. *Bulk-Material* bezeichnet werden (Walter 2013, S. 10). Aus dem Englischen übersetzt. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Nanomaterial lässt sich in Nanoobjekte und nanostrukturiertes Material einteilen. Zu den Nanoobjekten, bei denen eine oder mehrere externe Dimensionen im nanoskaligen Bereich liegen, zählen Nanopartikel, Nanofasern und Nanoplättchen (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). Zu den Nanopartikeln gehören Partikel einer Größenklasse, die in Struktur und Zusammensetzung klar definiert sind (Salomon 2009). Nanofasern gliedern sich in hohle Nanoröhren, starre Nanostäbchen und elektrisch leitende Nanodrähte. Nanostrukturiertes Material zeichnet sich durch nanoskalige interne oder Oberflächenstrukturen aus und umfasst u. a. zusammengesetztes Nanomaterial, zu dem Agglomerate und Aggregate zählen (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012).

Nanoröhren können aus unterschiedlichen Materialien gebildet werden, wie beispielsweise Kohlenstoff, Nickelchlorid oder Cadmiumjodid, wobei vorwiegend Kohlenstoff genutzt wird. Die Röhrenwand kann ein- oder mehrwandig, geschlossen ringförmig, spiralig und mit offenen oder geschlossenen Enden sein.

Fasern, Drähte und Stäbe zeigen eine linienförmige Struktur aus unterschiedlichen Materialien mit Varianz in Form und Länge (Salomon 2009).

Zu den kohlenstoffhaltigen Nanoröhren zählen Kohlenstoffnanoröhren CNT (Salomon 2009) und CNH (Abbildung 2) (TIE GmbH), deren strukturelle Basis eine Graphitatomsschicht bildet mit charakteristischer hexagonaler Kristallstruktur (Grigat et al. 2013; Yang et al. 2018).

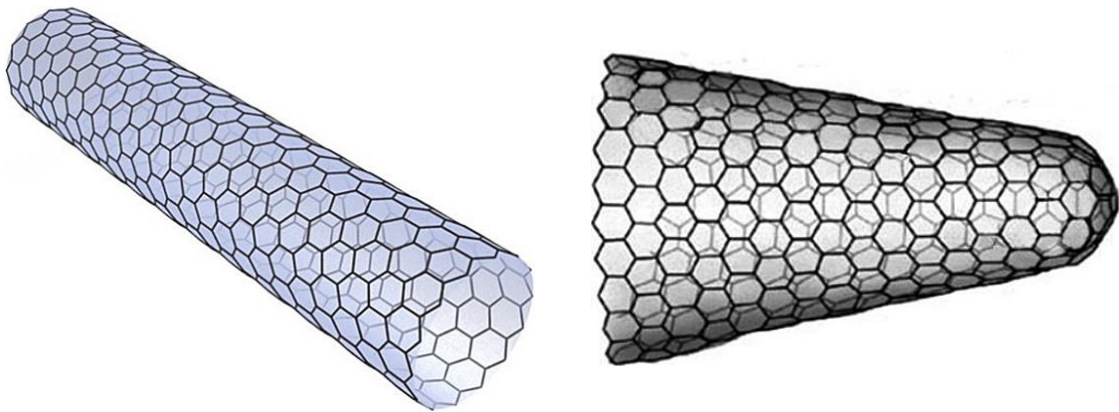


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur CNT und CNH. Die Abbildung auf der linken Seite zeigt ein CNT (Yang et al. 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. Die Abbildung auf der rechten Seite repräsentiert ein CNH (Pagona et al. 2007; Yang et al. 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons und Elsevier.

1.2 Kohlenstoffnanohörner

Die 1998 entdeckten Kohlenstoffnanohörner (CNH) haben eine Länge von 20 – 150 nm, einen Durchmesser von 3 – 25 nm und eine einseitig-geschlossene konische Gestalt. CNH besitzen gemäß ihrer namensgebenden Hornstruktur ein abgerundetes, stumpfes Ende, welches über pentagonale Kohlenstoffringe strukturiert wird. Der Winkel der gebildeten Kegelspitze beträgt über 20° (Molitor et al. 2013). Die röhrenförmige Außenwand besteht aus hexagonalen Kohlenstoffringen aus sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen (Karousis et al. 2016). CNH sind überwiegend einwandig im Gegensatz zu den CNT, jedoch strukturell ähnlich zu diesen aus Graphenröhren aufgebaut, die automatisch geformt werden, sobald einwandige Graphenseiten gebildet sind (Kasuya et al. 2002; Miyawaki et al. 2008). CNH liegen typischerweise nicht als einzelnes Horn vor (Abbildung 3) (Molitor und Javelle 2013). Sie bilden Agglomerate und Aggregate (Abbildung 1). Ihre Agglomerate enthalten Partikel mit einer Länge von 20 – 150 nm und agglomerieren im Durchmesser bis zu mehreren Mikrometern (Molitor et al. 2013; Molitor und Javelle 2013). Die pulverisierte Form der CNH besteht aus Aggregaten (TIE GmbH).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene CNH-Fractionen untersucht. Die CNH-Typ-A-Fraktion enthält ultrafein gekörnte CNH-Cluster mit einer primären Partikelgröße von 60 – 80 nm. Die CNH-Typ-B-Fraktion umfasst fein gekörnte CNH-Cluster mit einer primären Partikelgröße von 60 – 200 nm, wobei diese sich nach Ultraschallbehandlung und Lösung in Wasser aus zwei unterschiedlich großen Clustern zusammensetzt. Beide CNH-Fractionen bestehen aus reinem Kohlenstoff mit einem Kohlenstoff-Massenanteil von über 95 %. Die CNH-Fractionen beinhalten, bezogen auf den Kohlenstoff-Masseanteil, über 99 % CNH und weisen mit weniger als 5 % keine nennenswerten katalytischen Rückstände oder Verunreinigungen durch ihren Herstellungsprozess auf (TIE GmbH).

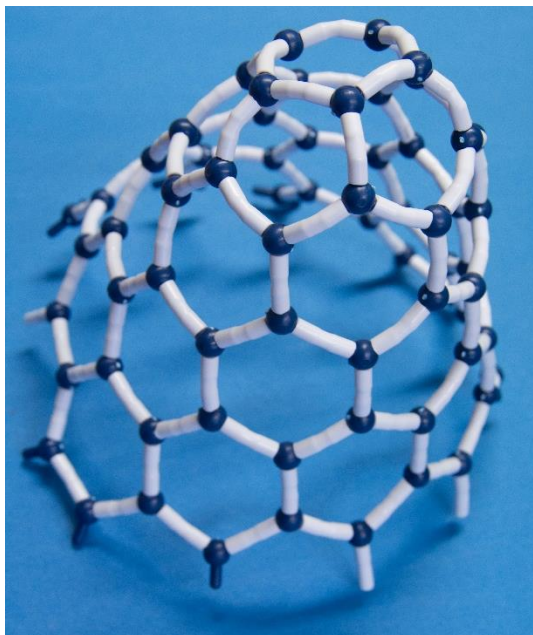


Abbildung 3: Schematisches CNH-Kristallgittermodell. Die Abbildung veranschaulicht das atomare Kristallgitter eines einzelnen CNH. Die hexagonale Struktur der röhrenförmigen, einwandigen Außenwand wird durch kovalent (weiße Stäbchen) miteinander verbundener Kohlenstoffatome (blaue Kugeln) gebildet. Das einseitig-geschlossene, stumpfe Ende des Horns wird über pentagonale Kohlenstoffringe strukturiert. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von TIE GmbH.

In apolarer Lösung lassen sich CNH in eine Suspension überführen, womit ihre Ausbereitung in die Atmosphäre verhindert wird. CNH lagern sich über starke Van-der-Waals-Kräfte spontan zu sphärischen Gebilden mit einer Aggregatlänge von bis zu mehreren Mikrometern (typischerweise $0,2 - 1 \mu\text{m}$ Länge) zusammen. Dabei bleiben die nanoskaligen kohlenstoffbasierenden Unterstrukturen erhalten (Molitor et al. 2013). CNH besitzen eine nanoporöse Oberfläche, deren Oberflächenvergrößerung auf Nanoebene weitere katalytische Reaktionsräume zum inneren Reaktionsraum bietet (Kasuya et al. 2002; Miyawaki et al. 2008). Morphologisch lassen sich CNH-Aggregate einteilen in dahlien-/blütenblattförmige (*dahlia-like/petal-like*), knospenförmige (*bud-like*) und in samenartige Typen (*seed-like*) (Molitor et al. 2013). Im Gegensatz zu dem knospenförmigen Typ, ragen bei der Dahlienform einzelne CNH-Aggregate blütenblattartig aus der Oberfläche hervor (Kasuya et al. 2002). Die vergrößerte Oberfläche der Dahlienform weist eine erhöhte Reaktionsfähigkeit auf (Kasuya et al. 2002; Miyawaki et al. 2008). Ebenfalls besitzen die Aggregate der Dahlienform eine höhere Verbrennungstemperatur, einen einheitlichen Durchmesser und im Inneren einwandige, robust vereinigte CNH mit gut ausgebildeten Graphenseiten. Im Unterschied hierzu setzen sich die Aggregate des knospenförmigen Typen strukturell einheitlich aus Röhren zusammen (Kasuya et al. 2002). Im Gegensatz zu den CNT unterscheiden sich CNH durch ihre hohe Reinheit ohne Rückstände von Metallen oder Katalysatoren (Miyawaki et al. 2008), ihre vorwiegend einwandige dreidimensionale Struktur, und der Fähigkeit im wässrigen Medium ohne Funktionalisierung zu dispergieren (Miyawaki et al. 2008; Molitor et al. 2013; Molitor und Javelle 2013; TIE GmbH). Durch die Zugabe zu anderen Materialien können CNH deren Eigenschaften verändern (Karousis et al. 2016).

Weitere Details über den Mechanismus der Entstehung der einwandigen CNH und ihrer Aggregate (Kasuya et al. 2002), sowie deren Deaggregation sind weiterhin unklar (Mittmann-Frank et al. 2009).

Die Anwendungsgebiete von CNH (Karousis et al. 2016) liegen unter anderem im industriellen Umfeld bei der Herstellung von verschiedenen Hybridmaterialien (Pagona et al. 2006; Sandanayaka et al. 2007), wie z. B. auch mit Polymeren (Mountrichas et al. 2009), Kraftstoffzellen (Yoshitake et al. 2002) und bei der Energietechnik in Solarzellen (Pagona et al. 2008; Lodermeier et al. 2015), Superkondensatoren (Hiralal et al. 2011; Deshmukh und Shelke 2013) und Lithium-Ionen-Batterien (Yuge et al. 2014). Anwendungsgebiete in der Chemie sind Katalysatoren und Elektroden bei elektrochemischen (Valentini et al. 2014) und photoelektrochemischen Anwendungen (Pagona et al. 2008). In der Medizin und Biologie gibt es Anwendungsmöglichkeiten bei der Markierung von Zellen (Li et al. 2012), als Biosensor (Liu et al. 2008; Shi et al. 2009; Tu et al. 2009; Yang F et al. 2014) und zum Medikamententransport mittels *Carrier* (Ajima et al. 2005; Ajima et al. 2008).

1.3 CdSe/CdS-NaSt

Die CdSe/CdS-NaSt haben einen anorganischen sphärischen Cadmiumselen-Partikel (QD) als Kern (*core particle*), der eine rote Fluoreszenz erzeugt. Die Cadmiumsulfid-Partikel dienen der Formgebung des Stäbchens und Abschirmung des Kerns. Die in dieser Arbeit untersuchten CdSe/CdS-NaSt haben einen Durchmesser von 4 – 8 nm und eine Länge von 30 – 60 nm. Die CdSe/CdS-NaSt können durch die Bindung von hydrophilen Liganden wie MPA und MeOH an ihrer Oberfläche eine kolloidale Lösung im hydrophilen Milieu bilden (Abbildung 4).

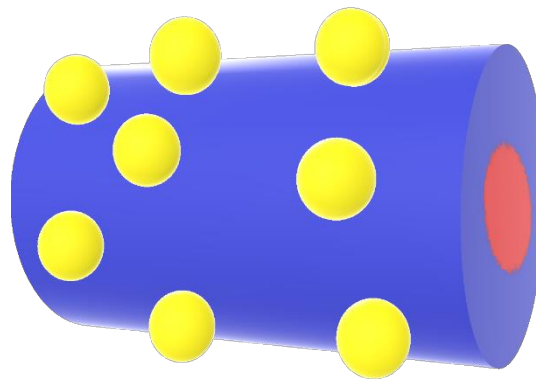


Abbildung 4: Querschnitt eines CdSe/CdS-NaSt-Modells. Abgebildet ist ein Querschnitt durch ein CdSe/CdS-NaSt-Modell. Zentral im Querschnitt sieht man den roten sphärischen CdSe-Partikel (roter Kreis) liegen. Dieser wird von CdS-Partikeln stäbchenförmig umgeben (blaue Struktur). Gelbe Kugeln verkörpern die hydrophilen Liganden MPA und MeOH, die als gebundene Lösungsvermittler dienen.

Die Anwendungsgebiete von modifizierten CdSe/CdS-NaSt liegen im industriellen Umfeld z. B. bei Mikrolasern (Zavelani-Rossi et al. 2010). CdSe/CdS-NaSt haben auf Grund ihrer photophysikalischen Eigenschaften wie Photostabilität, Helligkeit und als fluoreszenter Langzeitmarker zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Biologie und Medizin. Dazu gehören biologische Marker beim spezifischen *Biolabeling*, Messfühler bei zellulären

Redoxreaktionen und im *Imaging*, um die gezielte Markierung von Zellen, Geweben oder Tumoren, in der Diagnostik und der chirurgische Intervention zu unterstützen (Michalet 2005; Quarta et al. 2009; Tortiglione et al. 2009; Malvindi et al. 2011; Zacheo et al. 2011). In der Pharmakokinetik können CdSe/CdS-NaSt den Medikamententransport, z. B. als *Carrier* von Dopamin, und die kontrollierte Medikamentenfreisetzung unterstützen (Michalet 2005; Tortiglione et al. 2009; Malvindi et al. 2011).

1.4 Ablagerung von Nanopartikeln in den Atemwegen

Täglich nehmen die Atemwege des Menschen ein Volumen von über 10 000 Litern Luft inklusive der darin mitgelieferten Fremdstoffe wie Staubpartikel und Keime auf (Lüllmann-Rauch 2006, S. 339). Dabei unterscheiden sich Nanopartikel im Vergleich zu größeren Partikeln bei der Ablagerung in den Atemwegen (Oberdörster et al. 2005; Kreyling 2013). Die Depositionsrate eingeatmeter Nanopartikel liegt bei ca. 50 %, der Rest wird ausgeatmet (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). In den neunziger Jahren wurden mit Hilfe eines mathematischen Modells des menschlichen Atemtraktes Ablagerungsfractionen eingeatmeter, einzelner, nicht aggregierter Partikel mit vorgegebener Größe in den menschlichen Atemwegen ermittelt (Smith 1994). Eingeatmete 1 nm große Partikel lagerten sich zu 90 % im nasopharyngealen Bereich ab; die restlichen 10 % dieser Fraktion in der tracheobronchialen Region. 5 nm große Partikel lagerten sich in allen drei Abschnitten des Atemtraktes zu jeweils 30 % ab. 20 nm große Partikel lagerten sich zu 50 % in der Alveolarregion der Lungen ab (Oberdörster et al. 2005; Kreyling 2013). Schwebeteilchen, die einen Durchmesser unter 200 nm aufweisen, gelangten bis in die Alveolen (Behrends et al. 2010, S. 227). Bei Nanofasern ist deren Geometrie bei der Ablagerung von Bedeutung. Über 20 μm Länge führt zu einer vermehrten Ablagerung an den Abzweigungen der Bronchiolen, sodass lokal deren Dosis steigt (Halter und Mangelsdorf 2017). Asbestähnliche Auswirkungen erzeugen über 20 μm lange und über 80 μm dicke CNT im Lungengewebe. Unter einer Länge von 5 μm wurde durch sie kein Effekt erzielt (Schober et al. 2012).

Neben der Größe sind die Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel, Ladung, Form und Aggregation entscheidende Faktoren für die Verteilung, die Ablagerung und den weiteren Verbleib, u. a. durch Translokation, der Nanopartikel. In kontrollierten klinischen Studien eingesetzte labortechnisch hergestellte Nanopartikel führten zu großen Ablagerungsmengen im gesamten Atemtrakt (Grigat et al. 2013). Nanopartikel führen in den tiefen Atemwegen zu schädigenden Entzündungsreaktionen im Gewebe, sodass Nanopartikel leichter permeieren und so eine höhere systemische Verteilung besteht (Gebel 2017). Da bei Probanden mit Asthma oder chronisch obstruktiver Lungenentzündung bereits krankheitsbedingt eine schädigende Entzündung der Atemwege vorliegt, ist bei ihnen dieser Effekt verstärkt (Oberdörster et al. 2005).

1.5 Reinigungsmechanismen der Atemwege bei Nanopartikeln

Allgemein erfolgt die Reinigung von Nanopartikeln aus der Lunge langsamer als bei größeren Partikeln (Ferin und Oberdörster 1992; Möller et al. 2008; Möller et al. 2009; Heinrich 2013; Kreyling 2013). Die Reinigungseffizienz ist abhängig von Partikelgröße, dem Ort der Deposition (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012), von den Partikeleigenschaften (Kreyling und Scheuch 2000; Möller et al. 2009) und von der Spezies, sodass Resultate aus Nagetierversuchen nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind (Kreyling 2013).

Grundsätzlich ist die mukoziliäre Reinigung in den konduktiven Atemwegen eine sehr effektive und schnelle Funktion für die Reinigung abgelagerter Teilchen, deren Reinigungsphase etwa 6 – 12 Stunden dauert (Kreyling und Scheuch 2000; Möller et al. 2008). Mit abnehmender Partikelgröße sinkt die Effektivität der mukoziliären Reinigung und es entsteht eine Fraktion von nur langsam zu reinigenden Partikeln, die über 60 % Partikel kleiner als 1 µm enthält (Kreyling und Scheuch 2000; Möller et al. 2008). Bei der Reinigung dieser Fraktion wirken Makrophagen durch Phagozytose mit (Kreyling und Scheuch 2000).

Die Reinigung der peripheren Lunge ist generell viel langsamer (Möller et al. 2008) und erfolgt zu den konduktiven, zilienträgenden Atemwegen, zu hilären Lymphknoten, ins Interstitium und in subpleurale Räume. Das Epithel der peripheren Lunge nutzt zur Langzeit-Partikel-Reinigung verschiedene Mechanismen, die miteinander konkurrieren oder parallel ablaufen. Deren zwei Hauptwege sind erstens die physikalische Translokation von Partikeln und zweitens ein chemischer Reinigungsprozess (Oberdörster et al. 2005; Kreyling 2013). In den zilienfreien terminalen Luftwegen können Partikel auch lebenslang persistieren (Kreyling und Scheuch 2000).

Der freie Partikeltransport aus der peripheren Lunge zu den konduktiven Atemwegen spielt eine untergeordnete Rolle (Kreyling und Scheuch 2000). In der Alveolarregion translozieren schwer lösliche Nanopartikel ins Interstitium (Ferin und Oberdörster 1992; Kreyling und Scheuch 2000; Oberdörster et al. 2005) oder in Endothelzellen (Oberdörster et al. 2005). Die Translokation hängt von der Anzahl, der Größe, der Oberflächenchemie, der Ladung, sowie Konzentration und Häufigkeit der Aufnahme von Nanopartikeln ab (Ferin und Oberdörster 1992; Oberdörster et al. 2005; Kreyling und Geiser 2009). In Tierexperimenten wurde herausgefunden, dass durch ansteigende Dosierungen und abnehmende Partikelgröße die interstitielle Aufnahme zunimmt (Ferin und Oberdörster 1992). Interstitiell erhalten Nanopartikeln Kontakt zur Blut- und Lymphbahn und können weitere sensible Ziele wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz oder Herz infiltrieren (Ferin und Oberdörster 1992; Oberdörster et al. 2005).

Die chemische Zersetzung zur Reinigung der Atemwege kann in jeder Atemwegsregion stattfinden und richtet sich an biolösliche Partikel oder Komponenten der Partikel, die entweder fettlöslich oder in intrazellulären und extrazellulären Flüssigkeiten löslich sind. Gelöste Stoffe können die Absorption und die Diffusion unterwandern und an Proteine oder andere

subzelluläre Strukturen binden (Oberdörster et al. 2005). Intrazellulär erfolgt die Zersetzung der Partikel nach Phagozytose in Alveolarmakrophagen oder anderen phagozytierenden Zellen (Kreyling und Scheuch 2000).

1.6 Zelluläre Interaktionen von Nanopartikeln

Diese Arbeit untersucht die toxische Wirkung von Nanomaterialien auf die Zellen der Atemwege. Nanopartikel können bestimmte Proteine binden, die die Nanopartikel umhüllen und so die Aufnahme in Zellen, ihre Verteilung bis hin zu einer Festlegung nur zu bestimmten Orten zu gelangen beeinflussen (Kreyling 2013). Diese Möglichkeit besteht aufgrund ihrer Größe und gilt nicht für größere Partikel (Kreyling und Geiser 2009).

Synthetische Nanopartikel können menschliche, semipermeable Membranen durchdringen (Grigat et al. 2013; Kreyling 2013) und so in unterhalb des respiratorischen Epithels gelegene Zielorgane gelangen und dort akkumulieren (Kreyling 2013). Ebenso sind Diffusion und Endozytose mögliche zelluläre Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln (Grigat et al. 2013). Auch bei Menschen kann man eine hohe Translokationsrate von Nanopartikeln annehmen (Oberdörster et al. 2005). Je nach Größe und Oberflächeneigenschaft der Nanopartikel haben diese eine hohe Translokationsrate, bewegen sich bevorzugt zu Mitochondrien und halten sich in diesen auf (Li et al. 2003; Oberdörster et al. 2005; Kreyling 2013).

1.7 Toxikologische Eigenschaften von Nanopartikeln

Inwiefern Nanopartikel toxische Auswirkungen auf den Menschen zeigen, muss individuell für jeden einzelnen Stoff untersucht werden. Allein über die geringe Größe von Nanopartikeln kann man keine Rückschlüsse auf ihr Sicherheitsrisiko schließen (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). Hierzu ist eine komplette chemisch-physikalische Charakterisierung als Grundlage für die Risikoabschätzung notwendig (Grigat et al. 2013). Generelle Pauschalisierungen, die über nicht-nanoskalige Materialien herangezogen werden, sind unzureichend, um eine mögliche Humantoxizität zu bestimmen. So hat beispielsweise Titandioxid kaum Allgemeintoxizität, wurde jedoch von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) auf Grund von tierexperimentellen Langzeitinhalationsversuchen mit beiden Größenformen als erwiesen kanzerogen eingestuft (Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012). Faserförmige Titandioxidpartikel verursachten eine höhere Zytotoxizität als sphärische Partikel in tierischen Alveolarmakrophagen (Salomon 2009). Konzentrationen ab 100 mg/mL Titandioxidpartikel führten an Haut- und Lungenzellen zur Schädigung und Entzündungsreaktionen. Hierbei ist die Art des Materials, Struktur und Dosis der Partikel von Bedeutung (Salomon 2009). Größenbedingt sollte man von einem gesteigerten Potential für eine kanzerogene, teratogene und mutagenen Zellschädigung ausgehen (Grigat et al. 2013). Es fehlen standardisierte Messmethoden zur Charakterisierung

(Grigat et al. 2013). Zudem sind toxikologische Tests nicht immer geeignet, um Effekte der synthetischen Nanopartikel abzubilden (Salomon 2009).

1.8 Zielsetzung

In dieser experimentellen Dissertation werden die zytotoxischen Effekte der synthetischen Nanomaterialien CNH und CdSe/CdS-NaSt am Beispiel der zwei bronchioloalveolären Lungentumorgewebszelllinien NCI-H322 und A-549 *in vitro* untersucht. Mittels des Neutralrottests und des wasserlöslichen Tetrazoliumsals-1(WST-1)-Tests werden die zytotoxischen Effekte gemessen. Dabei untersucht der Neutralrottest die Zellvitalität, die eine intakte lysosomale Membran und Zellmembran voraussetzt. Der WST-1-Test bestimmt die mitochondriale Aktivität, die durch die metabolische Reduktaseaktivität vermittelt wird.

Diese Dissertation befasst sich mit den folgenden Fragestellungen:

- (1) Untersuchung, ob die beiden CNH-Fraktionen, die sich in ihrer Größe unterscheiden, Auswirkungen auf die Zellvitalität bzw. die mitochondriale Aktivität der zwei unterschiedlichen bronchioloalveolären Lungentumorgewebszelllinien NCI-H322 und A-549 haben. Dabei soll untersucht werden, ob die beiden Zelllinien Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber CNH zeigen und ob die Partikelgröße Einfluss auf die Zytotoxizität hat.
- (2) Untersuchung, ob CdSe/CdS-NaSt Auswirkungen auf die Zellvitalität bzw. die mitochondriale Aktivität der zwei Lungentumorgewebszelllinien NCI-H322 und A-549 haben. Dabei soll überprüft werden, ob die beiden Zelllinien Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber CdSe/CdS-NaSt aufzeigen und inwiefern Liganden (MPA und MeOH) der CdSe/CdS-NaSt Effekte auf die Lebensfähigkeit der zwei Lungentumorgewebszelllinien haben.
- (3) Untersuchung, ob sich die Zellvitalität bzw. die mitochondriale Aktivität der zwei untersuchten Zelllinien nach Exposition mit den verschiedenen synthetischen Nanomaterialien unterscheidet und inwiefern die Größe bzw. Form von Nanopartikeln die zytotoxische Wirkung auf die verschiedenen Zelllinien beeinflusst.

2 Material und Methoden

Im Zeitraum Juli 2013 bis Juni 2014 wurden die Testreihen zur *In-vitro*-Untersuchung der Zytotoxizität der synthetischer Nanomaterialien CNH und CdSe/CdS-NaSt auf Zellen des menschlichen Atemtraktes im S1-Labor der Abteilung Arbeits-, Sozial-, und Umweltmedizin der medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Die zwei Zelllinien NCI-H322 und A-549 werden mit den Nanomaterialien CNH und CdSe/CdS-NaSt in verschiedenen Ausprägungen behandelt. Die Auswirkungen auf die Zellvitalität wird mit dem Neutralrottest bzw. die mitochondriale Aktivität mit dem WST-1-Test untersucht.

Unter Kenntnisnahme der Biostoffverordnung (BioStoffV), die die Anforderungen des Arbeitsschutzes bezüglich biologischer Arbeitsstoffe, wie z. B. Zellkulturen, festlegt, wurde unter nötigen Schutzmaßnahmen zur Sicherheit und zum Gesundheitsschutz der Beschäftigten (Gefährdungsbeurteilung nach §5 ArbSchG) gearbeitet. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen und unter der Beachtung sicherer mikrobiologischer Arbeitsweisen durchgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Nanomaterialproben

Diese Arbeit untersucht die auf Kohlenstoff basierenden, reinen CNH und die schwermetallhaltigen CdSe/CdS-NaSt.

2.1.1.1 CNH

In dieser Arbeit werden zwei Arten von CNH untersucht: CNH Typ A und CNH Typ B, die in pulverisierter Form von der TIE GmbH, Griesheim, bezogen wurden (Molitor et al. 2013). Die CNH-Typ-A-Fraktion enthält ultrafein gekörnte CNH-Cluster mit einer primären Partikelgröße von 60 – 80 nm. Die CNH-Typ-B-Fraktion umfasst fein gekörnte CNH-Cluster mit einer primären Partikelgröße von 60 – 200 nm.

2.1.1.2 CdSe/CdS-NaSt

Die CdSe/CdS-NaSt sowie deren Liganden 3-Mercaptopropionsäure (MPA) und Methanol (MeOH) wurden als Lösung von der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt. Die CdSe/CdS-NaSt-Lösungen wiesen Konzentrationen von 2,5 g/L und 4,1 g/L auf. Sie enthalten Nanostäbchen (*quantum rods*) mit einem Durchmesser von 4 – 8 nm und einer Länge von 30 – 60 nm.

Die Lagerung erfolgt unter Lichtausschluss in einer wässrigen 0,1-molaren KOH-Lösung, die einen stark basischen pH-Wert von etwa 13 hat. In dieser Lösung liegen die Nanostäbchen einzeln dispergiert vor.

2.1.2 Zelllinien

In dieser Arbeit werden Versuche mit den Zelllinien NCI-H322 und A-549 durchgeführt. Es sind immortalisierte, adhären einschichtig wachsende, humane Lungentumorzelllinien. Sie sind bereits charakterisiert und dienen der Forschung als Testsystem für die menschliche Lunge, um die Zytotoxizität von Chemikalien in *In-vitro*-Versuchen zu evaluieren.

2.1.2.1 NCI-H322

Die Zelllinie NCI-H322 (Gazdar et al. 1990; Sigma-Aldrich 2017) wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Gillingham, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland) bezogen. Der Ursprung dieser humanen Zelllinie ist ein primär wachsendes bronchioloalveoläres Karzinom, das 1981 einem 52-jährigen, männlichen, hellhäutigen Patienten entnommen wurde. Die Zelllinie gehört nach histologischer Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Travis et al. 2015) zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (*non small cell lung carcinoma, NSCLC*) vom Subtyp eines Adenokarzinoms. Die Zelllinie NCI-H322 repräsentiert Zellen der bronchioloalveolären Luftwege (Bronchiolen und Alveolen). Die Zellen haben zytoplasmatische Strukturcharakteristika von Keulenzellen (veraltet Clara-Zellen) und exprimieren nachweislich das wichtige *surfactant*-assoziierte Protein (SP-A). Im apikalen Zytoplasma weisen sie dichte Granula auf. Die lichtmikroskopische Abbildung 5 zeigt einen Zellverband dicht wachsender NCI-H322-Zellen.

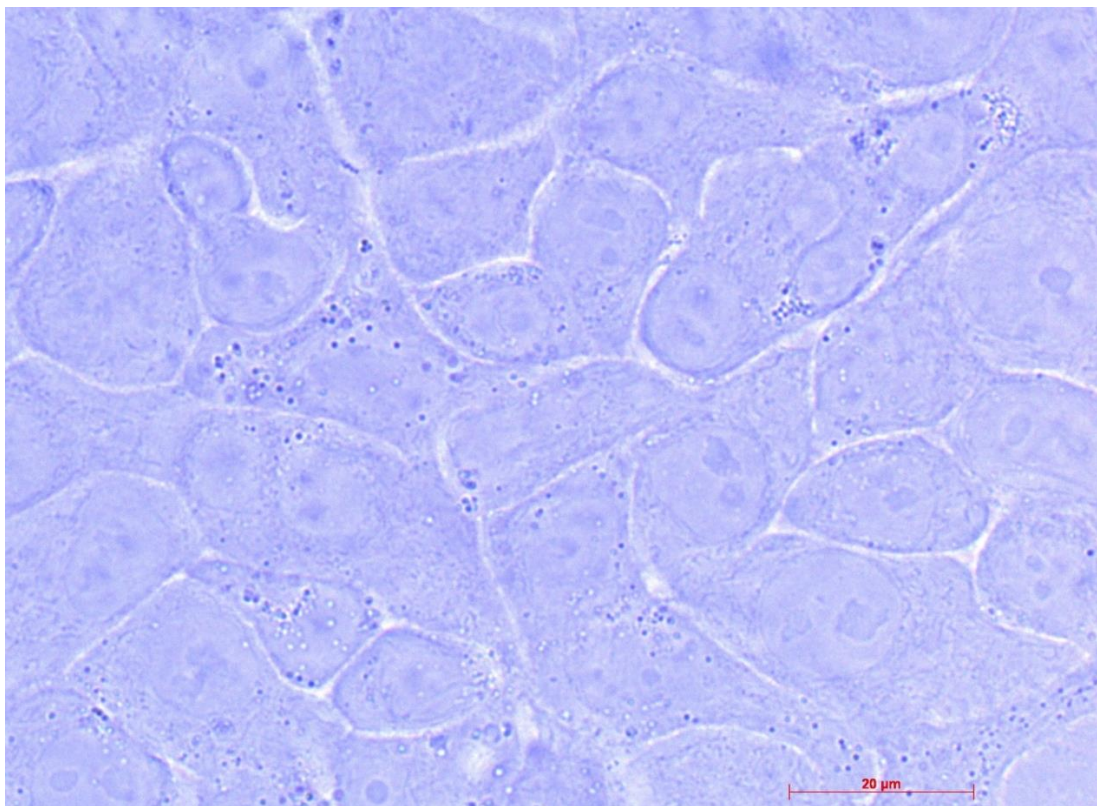


Abbildung 5: NCI-H322-Zellen. NCI-H322-Zellen in GebrauchsmEDIUM nach 48 Stunden Inkubation unter humiden Wachstumsbedingungen bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre. Zu sehen ist ein dichter Zellverband der NCI-H322-Zellen. Die Zellmembran als äußere Begrenzung ist zu erkennen, sowie im inneren Zellkerne und weitere zytoplasmatische Strukturen. Aufgenommen am 2014-06-26.

2.1.2.2 A-549

Die Zelllinie A-549 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - Menschliche und Tierische Zellkulturen aus Braunschweig mit der DSMZ-Nummer: ACC 107 bezogen. Die Herkunft dieser epithelialen Zelllinie ist ein humanes Adenokarzinom der Lunge, das 1972 bei einem 58-jährigen, europäischen Mann entnommen wurde (Giard et al. 1973). Die Zellen sind vergleichbar mit Alveolarepithelzellen Typ 2 und wachsen adhären als Monozellschicht mit einer Verdopplungszeit von ca. 40 Stunden (Lieber et al. 1976; Smith 1977; Rahman et al. 1995; DSMZ). Die lichtmikroskopische Abbildung 6 zeigt eine A-549-Zelle.



Abbildung 6: A-549-Zelle. Zentral dargestellt ist eine A-549-Zelle im Gebrauchsmedium nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre. Man erkennt den Zellkern der A-549-Zelle und eine insgesamt eher längliche, spindelförmige Zelle. Aufgenommen am 2014-04-15.

2.1.3 Zytotoxizitätstests

2.1.3.1 Neutralrottest

Der Neutralrottest nach Borenfreund und Puerner ist ein sensitiver, zuverlässiger, günstiger und zugleich reproduzierbarer *In-vitro*-Test, der zum Screening möglicher Giftstoffe eingesetzt wird (Borenfreund und Puerner 1985). Der Neutralrottest gehört nach OECD-Richtlinie zu den Standard-Zytotoxizitätstests für die Untersuchung von Chemikalien (OECD 2004).

Lebende Zellen nehmen den schwach kationischen Neutralrotfarbstoff, der bei pH 7,4 ungeladen ist, über nicht-ionische Diffusion und aktiven Transport durch die Zellmembran auf (Borenfreund und Puerner 1985; Gstraunthaler und Lindl 2013). Der Neutralrotfarbstoff wird in Lysosomen (anionische Reste der lysosomalen Zellmembran) von lebenden Zellen (Borenfreund und Puerner 1985) und zum Teil auch in proliferierender DNA (Gstraunthaler und Lindl 2013) angereichert. Im sauren Milieu (pH 5) der Lysosomen wird Neutralrot zum Ion (rote Farbe) und kann das Lysosom nicht mehr verlassen (Ionenfalle). Tote Zellen färben sich nicht an, da sie keine intakten Lysosomen besitzen. Bei geschädigten Zellen kann die Aufnahme des Farbstoffes vermindert sein, da es zu Störungen in der lysosomalen Membran kommt. Zwischen der optischen Dichte des im Neutralrottest extrahierten Farbstoffs und der Zahl der überlebenden Zellen besteht eine lineare Beziehung (Borenfreund und Puerner 1985).

Zu den mit den Verdünnungsstufen bzw. Kontrollen inkubierten und gespülten Zellen werden für den Neutralrottest reihenweise 100 µL Neutralrotlösung pro Kavität auf die Zellen pipettiert. Die letzte Spalte für den Leerwert enthält für die photometrische Messung nur Zellen und einfachkonzentrierte PBS-Lösung.

Die Zellen werden für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Neutralrotlösung durch festes Ausklopfen der umgedrehten Mikrotiterplatte aus den gesamten Kavitäten entfernt. Die Reaktion wird durch Zugabe von jeweils 100 µL Waschlösung pro Kavität gestoppt. Die Waschlösung wird sofort wieder durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte entfernt, wobei auch nicht in die Zellen aufgenommene Neutralrotfarbstoffreste eliminiert werden. Die Farbextraktion erfolgte durch Zugabe von jeweils 100 µL Stopplösung pro Kavität. Die Mikrotiterplatte wird mit geschlossenem Deckel für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Sekunden langem Schütteln im Mikrotiterplatten-Photometer wird die Absorptionsmessung mit einer Wellenlänge von 540 nm sowie der Referenzwellenlänge 405 nm durchgeführt.

2.1.3.2 WST-1-Test

Der WST-1-Test dient zum Nachweis einer intakten Atmungskette in den Mitochondrien auf enzymatischer Ebene. Die zelluläre Dehydrogenaseaktivität ist gegenwärtig so am sensitivsten nachzuweisen (Gstraunthaler und Lindl 2013, S. 131 ff). Der klare, leicht-rötliche Farbstoff WST-1 wird final durch Stammmedium verdünnt eingesetzt. Das WST-1-Reagenz ist ein Tetrazoliumsalz und enthält ein Elektron-Kopplungsreagenz in phosphatgepufferter

Salzlösung. Mitochondriale Dehydrogenasen, beispielsweise die Succinat-Dehydrogenase in metabolisch aktiven Zellen, spalten das WST-1-Reagenz in seine reduzierte Form, den stark roten Farbstoff Formazan. Je mehr funktionsfähige Zellen vorhanden sind, desto höher ist die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und damit die Menge des gebildeten Formazans.

Zu den mit den Verdünnungsstufen bzw. Kontrollen inkubierten und gespülten Zellen werden für den WST-1-Test reihenweise 100 µL frisches Stammmedium und 10 µL WST-1-Lösung gegeben. Die Zellen werden für 30 Minuten bei 37 °C und 5-%-CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Menge des gebildeten Formazans mit dem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Nach 60 Sekunden langem Schütteln im Photometer wird die Absorptionsmessung mit einer Wellenlänge von 440 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm durchgeführt.

2.1.4 Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits

Der Einsatz der in Tabelle 1 aufgeführten Standardlaborchemikalien erfolgt in p.-A.-Qualität.

Tabelle 1: Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits

Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits	Hersteller
„MB Taq DNA Polymerase“ (5U/µL)	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
RPMI 1640 Medium, 2,0 g/L NaHCO ₃ , stabilem Glutamin, niedrigem Endotoxin	Biochrom AG, Berlin
Agarose für DNA-Elektrophorese, reinst	Serva, Heidelberg
Basenpaarmarker „DNA Ladder 100 bp“	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Borsäure, H ₃ BO ₃ , M = 61,83 g/mol	Amresco, Solon, OH, USA
Calciumchlorid-Dihydrat, CaCl ₂ · 2H ₂ O, M = 147,02 g/mol	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO), C ₂ H ₆ OS, M = 78,13 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, C ₂ H ₄ OH, M = 60,05 g/mol	Fluka Chemika, Neu-Ulm
Ethanol ≥ 99,8 %, vergällt mit ca. 1 % MEK, 25 L	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), C ₁₀ H ₁₂ N ₂ Na ₄ O ₈ · x(H ₂ O), M = 380,17 g/mol	Amresco, Solon, OH, USA
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt
Glycerin, C ₃ H ₈ O ₃ , M = 92,09382 g/mol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Incubator-Clean BC	AppliChem, Darmstadt

Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits	Hersteller
Kaliumhydroxid, KOH, M = 56,11 g/mol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mykoplasmen-Nachweis-Kit „VenorGeM Classic“, Version 1.4	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Sulfat-Antibiotikallösung (P/S), 100-fach konzentriert, 10.000 U/mL, 10.000 µg/mL	Biochrom AG, Berlin
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) „PBS-Dulbecco“, 10-fach konzentriert	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure 37 %, HCl, M = 36,46094 g/mol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, C ₄ H ₁₁ NO ₃ , M = 121,14 g/mol	Roth, Karlsruhe
Trypsin 0,25 % (w/v), in PBS, ohne Ca ²⁺	Biochrom AG, Berlin

Die Tabelle führt auf ihrer linken Seite die in dieser Arbeit verwendeten Namen von Reagenzien, Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionskits auf, sowie nach Möglichkeit weitere Produktdetails wie die Konzentration, die Summenformel und die molare Masse. Die rechte Seite zeigt den jeweiligen Hersteller des Produktes.

2.1.5 Farbstoffe

Die Tabelle 2 listet die in dieser Arbeit benutzten Farbstoffe auf.

Tabelle 2: Farbstoffe und deren Hersteller

Farbstoff	Hersteller
Bromphenolblau, C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S, M = 669,96 g/mol	Fluka Chemika, Neu-Ulm
„Cell Proliferation Reagent WST-1“ („water soluble tetrazolium 1“), 8 mL für 800 Tests. Katalognummer: 05015944001	Hoffman-La Roche, Rotkreuz, Schweiz
Ethidiumbromid, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ , M = 394,33 g/mol	Fluka Chemika, Neu-Ulm
Neutralrotlösung, enthält 3,3 g Neutralrot/L in DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	SIGMAR-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄) 0,5 % (w/v) und NaCl 0,9 % in Wasser	Biochrom AG, Berlin
Xylencyanol, C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₇ S ₂ , M = 538,6 g/mol	Fluka Chemika, Neu-Ulm

Die Tabelle führt auf ihrer linken Seite die in dieser Arbeit verwendeten Namen der Farbstoffe auf, sowie weitere Produktdetails wie die Konzentration, die Summenformel und die molare Masse. Die rechte Seite zeigt den jeweiligen Hersteller des Produktes.

2.1.6 Lösungen, Puffer und Zellkultur-/Medien

Wässrige Lösungen und Puffer werden mit entionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage hergestellt. Der pH-Wert wird mit 1-molarer HCl-Lösung bzw. 0,1-molarer KOH-Lösung eingestellt. Es werden nur sterile Verbrauchsmaterialien genutzt. Benötigte Lösungen werden autoklaviert oder steril filtriert. Die Medien werden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf

Raumtemperatur erwärmt. Die Herstellung der einzelnen Lösungen wird im Folgenden beschrieben.

2.1.6.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1-fach konzentriert

PBS ist eine Standardpufferlösung, die für verschiedene Anwendungen, z. B. als Waschlösung für Zellen, genutzt wird.

Für einen Liter einer 1-fach konzentrierten Lösung werden 100 mL 10-fach konzentrierte PBS und 900 mL entionisiertes H₂O zusammen pipettiert.

2.1.6.2 Penicillin/Streptomycinsulfat-Antibiotikallösung (P/S)

Diese Lösung wird als 100-fach-Konzentrat mit 10.000 U/mL bzw. 10.000 µg/mL gebrauchsfertig gekauft. Die Lösung wird zu jeweils 5 mL pro Röhrchen aliquotiert bei -20 °C tiefgefroren.

2.1.6.3 Fötale Kälberserum (FCS)

Diese Lösung wird gebrauchsfertig als *FBS Superior* gekauft und zu jeweils 10 mL pro Röhrchen aliquotiert bei -20 °C tiefgefroren.

2.1.6.4 0,25%-Trypsinlösung

Diese Lösung wird gebrauchsfertig bezogen und zu jeweils 5 mL aliquotiert bei -20 °C tiefgefroren.

2.1.6.5 Stammmedium mit 1 % v/v P/S

Der 500 mL Mediumflasche (RPMI 1640 Medium) werden 5 mL P/S hinzugefügt.

Die P/S-Volumenkonzentration bezieht sich auf das Endvolumen der Gesamtlösung.

2.1.6.6 Gebrauchsmedium (Stammmedium mit 10 % v/v FCS)

Für 100 mL dieser Lösung werden 90 mL Stammmedium mit 1 % v/v P/S sowie 10 mL Fötale Bovines Serum (FCS) zusammen pipettiert.

Die FCS-Volumenkonzentration bezieht sich auf das Endvolumen der Gesamtlösung.

2.1.6.7 Anzuchtmedium (Zellkulturmedium mit 20 % v/v FCS)

In Abhängigkeit der Zelllinie wird diese FCS-Konzentration für die Anzucht bzw. die ersten Passagen nach dem Auftauen benötigt.

Für eine kleine Zellkulturflasche werden 5 mL Lösung hergestellt. Dabei werden zu 3 mL Zellsuspension in Gebrauchsmedium, weitere 1,5 mL Gebrauchsmedium und 500 µL FCS pipettiert. Größere Mengen können analog hergestellt werden.

Die FCS-Konzentration bezieht sich auf das Endvolumen der Gesamtlösung.

2.1.6.8 Einfriermedium (20 % v/v FCS und 10 % v/v DMSO)

Zur Herstellung von 5 mL Lösung werden 4 mL Gebrauchsmedium, 500 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) und 500 µL FCS zusammengegeben.

Die Lösung wird vor Gebrauch in Sarstedt-Röhrchen auf Eis heruntergekühlt.

2.1.6.9 Neutralrotlösung

Die Neutralrotlösung mit einer Konzentration von 0,05 g/L wird in einer 1:66-Verdünnung hergestellt. Für 66 Probenansätze einer 96-Kavitäten-Zellkulturplatte beträgt das benötigte Volumen 13 mL. Es werden 0,197 mL Neutralrotlösung (3,3 g/L) und 12,803 mL Stammmedium mit 1 % v/v P/S zusammen pipettiert.

Die Verdünnung wird in einer Schraubgewindeflasche mit angedrehtem Deckel hergestellt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C mit 5-%-CO₂-Atmosphäre begast. Die Flasche wird zehn Minuten mit fest verschlossenem Deckel in ein Ultraschallbad gestellt, sodass kleinste Kristalle in der Lösung zerstört werden. Im Anschluss wird die Lösung steril filtriert. Damit wird eine Störung des Neutralrottests durch Ablagerungen auf den Zellen unterbunden.

2.1.6.10 Waschlösung der Zellen (1-% v/v-Methanal-1-% v/v-Calciumchlorid-Lösung) im Neutralrottest

Bei der Herstellung dieser Lösung werden 5 mL 37-prozentiges Formaldehyd (Methanal) mit 1,8 g CaCl₂ · 2H₂O und 170 mL entionisiertem H₂O versetzt.

2.1.6.11 Stopplösung der Reaktion (1-% v/v-Eisessig-50-% v/v-Ethanol-Lösung) im Neutralrottest

Die Lösung wird durch Zugabe von 100 mL vergälltem Ethanol und 98 mL entionisiertem H₂O zu 2 mL Eisessig (reine Essigsäure) hergestellt.

2.1.6.12 0,1-molare KOH-Lösung

$M(\text{KOH}) = 56,1 \text{ g/mol}$

Für 100 mL dieser Lösung werden 0,561 g KOH abgewogen und 100 mL entionisiertem H₂O hinzugefügt.

2.1.6.13 1-molare HCl-Lösung

Für 50 mL Lösung werden zu 45,8 mL entionisiertem H₂O 4,2 mL 37-prozentige HCl pipettiert.

2.1.6.14 70-% v/v-Ethanolösung zur Flächendesinfektion

1000 mL Lösung werden durch Zugabe von 700 mL vergälltem Ethanol zu 300 mL entionisiertem H₂O hergestellt.

2.1.6.15 20-% v/v-DMSO-Lösung

Diese Lösung dient in den Versuchen als Positivkontrolle (PK). Bei dieser DMSO-Konzentration werden alle Zellen zu 100 % geschädigt und es resultieren nur noch Zellfragmente.

Für 1000 μL Lösung werden 200 μL DMSO und 800 μL Stammmedium mit 1 % v/v P/S zusammengegeben.

2.1.6.16 0,75-%-v/v-DMSO-Lösung

Diese Lösung dient in den CNH-Versuchen als Negativkontrolle (NK-0,75-%-DMSO).

Für die Herstellung von 1000 μL Lösung werden zu 992,5 μL Stammmedium mit 1 % v/v P/S 7,5 μL DMSO pipettiert.

2.1.6.17 RPMI-Medium-pH-Lösung

Diese Lösung dient in den CdSe/CdS-NaSt- und Ligandenversuchen als Negativkontrolle (NK-pH).

Für 2087 μL Lösung werden zu 1000 μL Stammmedium mit 1 % v/v P/S, 1000 μL 0,1 M KOH-Lösung und 87 μL 1 M HCl gegeben. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7,5 – 8.

2.1.6.18 Fünffachkonzentrierte TRIS-Borat-EDTA-Puffer-Stammlösung (TBE-Puffer-Stammlösung)

Die Herstellung erfolgt durch Zugabe von 27 g TRIS (Trisaminomethan), 13,75 g Borsäure und 1,8 g EDTA zu 1 L entionisiertem H_2O .

2.1.6.19 Einfachkonzentrierter TBE-Puffer (Laufpuffer)

Für 1000 mL Lösung werden zu 800 mL entionisiertem H_2O 200 mL fünffachkonzentrierte TBE-Puffer-Stammlösung gegeben.

2.1.6.20 Auftragepuffer (sechsfachkonzentriert)

Der Auftragepuffer dient zur Probenbeschwerung und -markierung beim Polymerasekettenreaktion(PCR)-Gellauf.

Für die Herstellung von 50 mL Lösung werden zu 18,6 mL entionisiertem H_2O 29,4 mL Glycerol (85-%-Lösung), 1 mL Bromphenolblau (5-%-Lösung) und 1 mL Xylencyanol (5-%-Lösung) pipettiert.

2.1.6.21 Ethidiumbromidstammlösung

Die Lösung wird durch Zugabe von 10 mg Ethidiumbromid zu 1 mL entionisiertem H_2O hergestellt.

2.1.6.22 2%-Agarosegel

Für die Herstellung von 100 mL Lösung werden in einen Erlenmeyer-Glaskolben zu 100 mL einfachkonzentriertem TBE-Puffer 2 g Agarose gegeben und unter Schwenken erwärmt und gelöst. Nach zweiminütigem Abkühlen werden 2 μ L EtBr-Lösung (Endkonzentration: 10 μ g/mL) hinzupipettiert und durch Schwenken des Kolbens homogenisiert.

2.1.6.23 PCR-Reaktionsmix

Die Herstellung des Reaktionsmixes erfolgt nach Gebrauchsanleitung des *VenorGeM-Mycoplasma-Detection-Kit*.

2.1.6.24 *Thermocycler*-Testansätze

Positivkontroll-DNA und *PCR-grade-Water* werden aus dem Lieferumfang des *VenorGeM-Mycoplasma-Detection-Kit* genutzt.

Es werden jeweils 25 μ L Ansätze hergestellt. Bei der Herstellung der Positivkontrolle werden 22 μ L PCR-Reaktionsmix, 2 μ L Positivkontroll-DNA und 1 μ L *PCR-grade-Water* zusammen pipettiert.

Die Negativkontrolle wird durch Zugabe von 3 μ L *PCR-grade-Water* zu 22 μ L PCR-Reaktionsmix hergestellt.

Bei den Zellkulturproben werden 3 μ L zentrifugierter Zellkulturüberstand zu 22 μ L PCR-Reaktionsmix pipettiert.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 3 aufgeführten Standardlaborverbrauchsmaterialien werden von handelsüblichen Unternehmen bezogen.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
„Combitips plus“, Dispensiervolumen: 0,5 mL, 5 mL, 12,5 mL, 25 mL und 50 mL	Eppendorf
„Parafilm M“	Pechiney Plastic Packaging
„PS-Röhrchen 13 mL“ (Sarstedt-Röhrchen) mit montiertem Eindrückstopfen, steril	Sarstedt
„SoftStrips mit Single Caps (Flachdeckel)“, 8er, 0,2 mL, farblos	Biozym Scientific GmbH
Feinstaubmaske mit Ausatemventil „silv-Air exxcel 7312 FFP3“	Uvex
Gewebekultur-Petrischalen „Easy Grip“, 35 x 10 mm	Becton Dickinson
Mikrotiterplatten „Nunc MicroWell Platten mit Nunclon Delta Oberfläche“, 96 Kavitäten, steril, mit Abdeckung	Thermo Scientific
Objektträger, gebrauchsfertig geputzt, Gläser geschliffen, Mattrand	Knittel
Rotrandfilter, steril, 0,2 µm Porengröße, 7 bar maximal	Whatman
Reaktionsgefäß „Safe-Lock Tubes“ (Eppendorf-Cup), 2,0 mL	Eppendorf
Spritzen „Discardit II“, 10 mL, zweiteilig mit Luer-Ansatz, steril	Becton Dickinson GmbH
Untersuchungshandschuhe „Sterling Nitril KC300“, puderfrei	Kimberly-Clark
Zellkulturflaschen für adhärente Zellen, Kappe ohne Filter, Wachstumsoberfläche 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt

Auf der linken Tabellenspalte ist der Namen der verwendeten Verbrauchsmaterialien gelistet, sowie nach Möglichkeit weitere spezifische Produktdetails. Die rechte Tabellenspalte nennt den jeweiligen Hersteller des Produktes.

2.1.8 Technische Geräte und Hilfsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, deren Modellbezeichnung und Hersteller werden in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte

Gerät/Modellbezeichnung	Hersteller
Auflichtmikroskope „Axioskop“ und „Axioskop 2 MOT“	Zeiss
Biofuge pico	Eppendorf

Gerät/Modellbezeichnung	Hersteller
Bruchemaschine	Ziegra, Schütt Labortechnik
Dampfsterilisator	Webeco
Dampfsterilisator „Varioklav“	Thermo Scientific
Duran Weithalsglasflasche mit Schraubdeckel	Schott, Biochrom KG, Sigmax
Elektrophoresesystem	Bio-Rad
Erlenmeyer-Glaskolben 250 mL	Fisherbrand
Finnpipette 1-5 mL	Thermo Scientific
Gel-Dokumentations-System „Gel Doc 100“	Bio-Rad
Gelträger und Kamm mit 20 Probenaschen	Bio-Rad
Geschirrspüler „Mielabor G7733“	Miele
Glasbechergläser	Schott
Glaszylinder 1000 mL	Simax
Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast „Invertoskop ID02“	Zeiss
Kühlschrank	Liebherr
Labor-Analysenwaage „MC1 Analytic AC 210 S“	Sartorius
Magnetrührer „MR 2002“	Heidolph
Mikrozentrifuge „FugeOne – two in one“	Starlab
Mikrotiterplatten-Photometer „Sunrise“	Tecan Austria GmbH
Mikrowelle „MWS 2819“	Bauknecht
„Multipette“	Eppendorf
Petrischalen aus Glas	Schott
Pipetten „Eppendorf reference“: 2-20 µL, 50-1000 µL, 2-200 µL, 20-300 µL und 0,5-20 µL	Eppendorf
Pipettenständer	Eppendorf
Reagenzgläser	Schott
Reagenzgläser mit Schraubgewindedeckel (Sonderanfertigung)	Glasgerätebau Ochs
Wasseraufbereitungssystem „Elix Advantage 3 System“	Merck Millipore
Sicherheitswerkbank „HERAsafe“	Heraeus Instruments
Thermometer	<i>keine Angaben zum Hersteller</i>

Gerät/Modellbezeichnung	Hersteller
Thoma-Zellzählkammer, hell-linig, 0,1 mm/0,025 mm ²	Brand
Tischkühlzentrifuge „ROTINA 35 R“	Hettich
Tischzentrifuge „Biofuge Pico“	Heraeus Instruments
Ultra-Tieftemperatur-Gefrierschrank	Sanyo
Ultraschallreiniger „Sonorex Super RK 100“	Bandelin
Universalwärmeschrank	Memmert
„Vortex Typ Reax 2000“	Heidolph
„Vortex-Genie2“	Scientific Industries
Wärme- und Trockenschrank	Heraeus Instruments
Wärme- und Trockenschrank „Thermo Scientific Function Line“	Heraeus Instruments
Wärme- und Trockenschrank	Memmert

Auf der linken Tabellenspalte ist der Namen der verwendeten Geräte/Modellbezeichnungen gelistet. Die rechte Tabellenspalte nennt den jeweiligen Hersteller des Produktes.

2.1.9 Mikroskopie

Die Begutachtung des Wachstums der Zelllinien in den Zellkulturflaschen erfolgt mit dem inversen Mikroskop Zeiss *Invertoskop ID02* mit Phasenkontrast. Arbeiten mit der Thoma-Zellzählkammer erfolgen unter dem Auflichtmikroskop Zeiss *Axioskop*. Es besitzt einen X-Y-Kreuztisch und einen 6-Fach-Objektivrevolver.

Die Detektion von Zellen (ggf. mit Nanopartikeleinschlüssen) erfolgt mit dem aufrechten Mikroskop Zeiss *Axioskop 2 MOT*. Dabei werden die folgenden Objektive des Typs *Plan Neofluar* eingesetzt: 20x/0,50, 40x/0,75 und 100/1,30 Oil. Als Kamera wird die Zeiss *Axio Cam MRc 5* genutzt.

2.1.10 Software

Die Messdaten des Photometers werden mit dem Programm *Tecan Magellan Clinical V 4.50* erzeugt und mit *Microsoft Excel* weiterverarbeitet. Die Graphen werden mit *OriginPro 8.5.0G* angefertigt. Für die Auswertung der PCR wird die *Bio-Rad Molecular Analyst Software 1.4* genutzt. Die Fotos unter dem Mikroskop werden mit *Zeiss AxioVision* erstellt und exportiert. Für die Nachbearbeitung der Abbildungen wird *GIMP* und *ImageJ* verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien NCI-H322 und A-549 werden entsprechend dem Verwendungszweck in Zellkulturflaschen, auf Mikrotiterplatten und für Abbildungen in Glasfärbewannen oder auf Petrischalen ausgestreut. Die Inkubation erfolgt unter optimalen konstant-kontrollierten humiden Wachstumsbedingungen bei 37 °C und 5%-CO₂-Atmosphäre. Die Zelllinien werden in identischem und zugleich spezifischem Gebrauchsmedium kultiviert. Um eine Überalterung der Zelllinien zu vermeiden, wird ab der zwanzigsten Passage der jeweiligen Zelllinie eine neue Kultur derselben Zelllinie herangezogen. Nachdem die reaktivierte Zelllinie in Gebrauchsmedium kultiviert und für die Versuche eingesetzt wird, wird die ältere Zelllinie verworfen.

Die NCI-H322-Zellen werden einmal wöchentlich passagiert. Drei Tage nach dem Passagieren erfolgt zur Gewährleistung von Wachstum und Vitalität der Zellen ein Gebrauchsmedienwechsel (Gstraunthaler und Lindl 2013). Die NCI-H322-Zellen werden 48 Stunden vor den Versuchen mit einer Konzentration von 19 000 Zellen/Kavität in eine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte ausgestreut.

Die A-549-Zellen werden zweimal wöchentlich passagiert und 24 Stunden vor den Versuchen mit einer Konzentration von 12 000 Zellen/Kavität in eine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte ausgestreut. Aufgrund neuer Erfahrungswerte, die mit dem vergleichenden Versuch vom 2014-03-06 dokumentiert wurden, werden ab dann 19 000 Zellen/Kavität ausgestreut.

Bei allen Vorgehensweisen liegen laborinterne zelllinienspezifische Erfahrungswerte zu Grunde. Vor den einzelnen Verfahren wird stets der Zustand der Zellen mit Fokus auf Morphologie, Vitalität, Wachstumsdichte und mögliche Kontaminationen unter dem inversen Mikroskop begutachtet.

2.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Thoma-Zellzählkammer

Die Zellkonzentration wird mit einer Thoma-Zellzählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Die Zählkammer wird mit der Zellsuspension befüllt. Vor dem Auszählen wird in Zehnfachvergrößerung überprüft, ob die Zellen gleichmäßig im Planquadrat der Zählkammer verteilt liegen. Zellhaufen werden weder ausgestreut noch ausgezählt. Die Zellsuspension hat eine Höhe von 0,1 mm. Ein 1 mm² großes Planquadrat enthält 16 Kleinquadrate. Die 16 Kleinquadrate werden mäanderförmig ausgezählt. Alle Zellen innerhalb eines Kleinquadrates werden gezählt. Zellen, die sich auf der oberen und linken Grenzlinie befinden, werden mitgezählt. Zellfragmente sowie Zellen, die sich auf der unteren oder rechten Grenzlinie befinden, werden nicht mitgezählt. Im Anschluss wird die Summe aus den Zählungen der 16 Kleinquadrate gebildet. Die Zellzahl ergibt sich bei einem Volumen von 1 mL aus der gezählten Zellzahl (N) mit folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] = \frac{N}{\text{Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Tiefe [mm]}} = \frac{N}{1 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm}} = \frac{N}{0,1 \text{ mm}^3} = \frac{N}{10^{-4} \text{ mL}} = \frac{N \cdot 10^4}{\text{mL}}$$

2.2.1.2 Trypanblautest

Nach Arbeitsschritten, wie z. B. dem Trypsinieren oder nach dem Auftauen einer adhärenen Zelllinie, wird die Zellvitalität mit dem Trypanblautest überprüft. Der Test ist eine Routineuntersuchung zur Ermittlung der Lebensfähigkeit von Zellen. Lebende Zellen werden auf Grund ihrer intakten Zellmembran durch den Vitalfarbstoff Trypanblau nicht angefärbt und erscheinen klein, rund und ungefärbt unter dem Mikroskop. Tote Zellen und geschädigte Zellen mit perforierter Zellmembran färben sich intensiv blau an und erscheinen angeschwollen unter dem Mikroskop. Mit dem Test wird nur die Integrität der Zellmembran nachgewiesen. Funktionsstörungen im Zellinneren lassen sich durch diesen Test nicht ermitteln (Louis und Siegel 2011; Gstraunthaler und Lindl 2013, S. 130 f).

Es werden 10 μL der Zellsuspension in ein mit 10 μL Trypanblau vorgelegten *Eppendorf-Cup* pipettiert und die Suspension vorsichtig durch langsames Auf- und Abpipettieren des Gesamtvolumens durchgemischt. Von der blauen Zellsuspension werden 10 μL auf den Objektträger einer Thoma-Zellzählkammer aufgetragen. Trypanblau wirkt direkt zytotoxisch; daher wird unmittelbar nach der Zugabe der Färbelösung unter dem Auflichtmikroskop die Zellvitalität begutachtet. Die Gesamtzellzahl wird als 100 Prozent gewertet und setzt sich aus toten und intakten Zellen zusammen. Das Verhältnis aus gefärbten zu ungefärbten Zellen ergibt die Vitalität in Prozent (Louis und Siegel 2011; Gstraunthaler und Lindl 2013, S. 131).

$$\text{lebende Zellen [\%]} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \cdot 100$$

In dieser Arbeit werden für weitere Tests eine Zellvitalität über 90 % und für die Anzucht eine Zellvitalität von über 50 % vorausgesetzt.

2.2.1.3 Einfrieren und Wieder-in-Kulturnahme einer Zelllinie

Vor dem Einfrieren einer Zelllinie wird nach dem Trypsinieren die Zellzahl mittels Thoma-Zellzählkammer bestimmt. Die final gewünschte Anzahl an Zellen pro Milliliter wird in das Sarstedt-Röhrchen pipettiert und sechs Minuten bei 200 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird vom Boden gelockert und in 1 mL vorgekühltem Einfriermedium auf Eis resuspendiert. Diese Zellsuspension wird bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und gelagert.

Zur Wieder-in-Kulturnahme einer Zelllinie werden die tiefgefrorenen Zellen im Sarstedt-Röhrchen im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter behutsamen Schwenken für maximal zwei Minuten aufgetaut, bis ein etwa reiskorn-großes Stück Eis übrigbleibt. Anschließend werden die Sarstedt-Röhrchen wieder auf Eis gestellt und die Zellen werden durch eine tröpfchenweise Zugabe von 5 mL Gebrauchsmedium vorsichtig resuspendiert. Dann wird die Zellsuspension für sechs Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig und unter Sicht auf das Pellet

dekantiert und verworfen. Das Pellet wird durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst und in 3 mL Gebrauchsmedium resuspendiert.

2.2.1.4 Konservierung einer Zellkultur

Die Zellen haben in einer großen Zellkulturflasche eine Wachstumsfläche von 75 cm². Nachdem sich ein fast konfluenter Zellrasen gebildet hat, wird die Zellkulturflasche mit 70-%-Ethanollösung von außen desinfiziert und unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen geöffnet. Das Kulturmedium (Gebrauchs- oder Anzuchtmedium) wird durch vorsichtiges Dekantieren verworfen. Es folgt ein Waschschriff mit 2 mL einfachkonzentrierter PBS-Lösung, welche mittels FinnpiPETTE über die am Boden der Zellkulturflasche wachsenden Zellen pipettiert wird. Durch vorsichtiges Bewegen der Zellkulturflasche werden alle Zellen benetzt und Kulturmediumrückstände mit der PBS-Waschlösung vollständig entfernt.

Es folgt der Zellverdau mittels der Protease Trypsin durch Zugabe von 2 mL 0,25-%-Trypsinlösung und anschließender Inkubation bei 37 °C und 5-%-CO₂-Atmosphäre. Durch Schwenken und leichtes Klopfen der Zellkulturflasche auf einen festen Untergrund wird der Zellverdau und somit der Übergang in eine Zellsuspension beschleunigt. Unter dem inversen Mikroskop mit Phasenkontrast erscheinen alle Zellen nun rundlich und schwimmend in der Trypsinlösung. Durch Zugabe von 3 mL Gebrauchsmedium mittels FinnpiPETTE wird das Trypsin in der Zellkulturflasche inaktiviert. Innere Seitenränder, an denen Zellsuspension haftet, wird durch mehrmalige Wiederaufnahme der Zellsuspension mit der FinnpiPETTE abgESPÜLT. Im Anschluss werden die 5 mL Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein Sarstedt-Röhrchen überführt. Das Sarstedt-Röhrchen wird bei 200 g sechs Minuten lang zentrifugiert, sodass sich ein Pellet auf dem Boden des Röhrchens bildet. Der Überstand wird unter Sicht auf das Pellet dekantiert und verworfen. Durch vorsichtiges Klopfen des Röhrchens wird das Pellet am Boden gelockert. Die Zellen werden je nach Pelletgröße in 3 – 5 mL Gebrauchsmedium in Suspension gebracht. Nach Zellzahlbestimmung wird das benötigte Volumen an Gebrauchsmedium für die gewünschte Zellkonzentration bestimmt. Anschließend werden die Zellen, je nach Verwendungszweck, in der ermittelten Menge Gebrauchsmedium oder auf Eis vorgekühltem Einfriermedium in eine Zellkulturflasche, eine Mikrotiterplatte oder ein Sarstedt-Röhrchen ausgestreut. Jegliche verwendete Zellkultivierungsobjekte werden mit dem Datum, der Zelllinie sowie der Passagennummer beschriftet.

2.2.1.5 Überprüfung der Reinheit einer Zellkultur

Durch Mykoplasmaspezien verursachte Verunreinigungen einer Zellkultur können zur Beeinträchtigung des Zellwachstums, der Proliferation und der Vitalität und sogar zu Fehlinterpretationen von Versuchsergebnissen führen (Gstraunthaler und Lindl 2013). Daher wird nach jeder dritten bis vierten Passage jede Zelllinie mit dem *Venor GeM Classic Mycoplasma Detection Kit* (Minerva Biolabs GmbH 2012) auf Kontaminationen durch Mykoplasmen getestet.

Das Testkit enthält die für eine PCR notwendigen Reagenzien, um Mykoplasmen spezifisch nachzuweisen. Als Polymerase wurde *MB Taq DNA-Polymerase* ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) verwendet.

Für den Test wird der Zellkulturüberstand als Probenmaterial genutzt, wobei eine Subkonfluenz der Zellen von mindestens 90 % vorausgesetzt wird. 500 μL Probenmaterial werden in einem *Eppendorf-Cup* bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad für zehn Minuten gekocht und anschließend in der Zentrifuge Biofuge pico bei 13 000 rpm für fünf Sekunden zentrifugiert. Störende Zellfragmente werden dadurch am Boden des *Eppendorf-Cups* angereichert, DNasen werden funktionsunfähig gemacht und Mykoplasmen lysiert. Der Überstand wird in ein neues *Eppendorf-Cup* überführt. 3 μL des Überstandes werden für den Test genutzt. Vor dem Testbeginn werden alle Reagenzien und Proben auf $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Die Rehydratisierung der Reagenzien aus dem Testkit erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Die nach Anleitung hergestellten Testansätze werden in den *SoftStrips* mit *Single Caps* verschlossen, kurz anzentrifugiert und durch das folgende *Thermocycler*-Programm bearbeitet: ein Zyklus bei $94 \text{ }^\circ\text{C}$ für zwei Minuten; 39 Zyklen mit dem Schema $94 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Sekunden, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Sekunden und $72 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Sekunden; Abkühlen auf $4 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einem 2-%-Agarosegel. Die hergestellte 2-%-Agarosegellösung wird in einen Gelschlitten gegossen, der sich in einer PCR-Flachgelkammer befindet und in den ein 20-Taschen-Probenkamm eingespannt wird. Nach ca. 30 Minuten ist die Agarose auspolymerisiert und fest. Der Probenkamm wird entfernt. Der Gelschlitten mit dem 2-%-Agarosegel wird der horizontalen Flachgelkammer entnommen, in die Elektrophoresekammer gestellt und mit einfachkonzentriertem TBE-Puffer überschichtet. Pro benötigter Gelprobentasche werden 20 μL Probenlösung mit 5 μL Auftragepuffer versetzt und die hergestellten 25 μL Lösung pro Probentasche aufgetragen. Der Basenpaarmarker wird vor und hinter den Proben in die Probentaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird bei 100 Volt für ca. 30 Minuten gestartet.

Die Bestandteile des Auftragepuffers weisen im Agarosegel während des Laufs bei Tageslicht Banden bei 750 – 200 bp (Xylencyanol) und bei 150 – 50 bp (Bromphenolblau) auf und dienen zur groben Orientierung.

Die unter UV-B-Licht (Wellenlänge 302 nm) sichtbaren DNA-Amplifikationsprodukte werden mit dem Geldokumentationssystem *Gel Doc 100* fotografiert. Dies wird durch die interkalierende Substanz EtBr ermöglicht, die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Dann werden die DNA-Amplifikationsprodukte der Proben mit der Positiv- und der Negativkontrolle verglichen. Das DNA-Fragment der internen Kontrolle sollte sich bei 191 bp befinden und in allen Proben gleich stark ausgeprägt sein. Zellkulturverunreinigungen durch Mykoplasmenspezies enthalten Banden zwischen 265 – 278 bp, wobei die interne Kontrolle irrelevant ist. Wird die PCR inhibiert oder ein fehlerhafter Testansatz aufgetragen, fehlt der Bandennachweis und die PCR wäre zu wiederholen sowie ggf. eine DNA-Aufreinigung nötig.

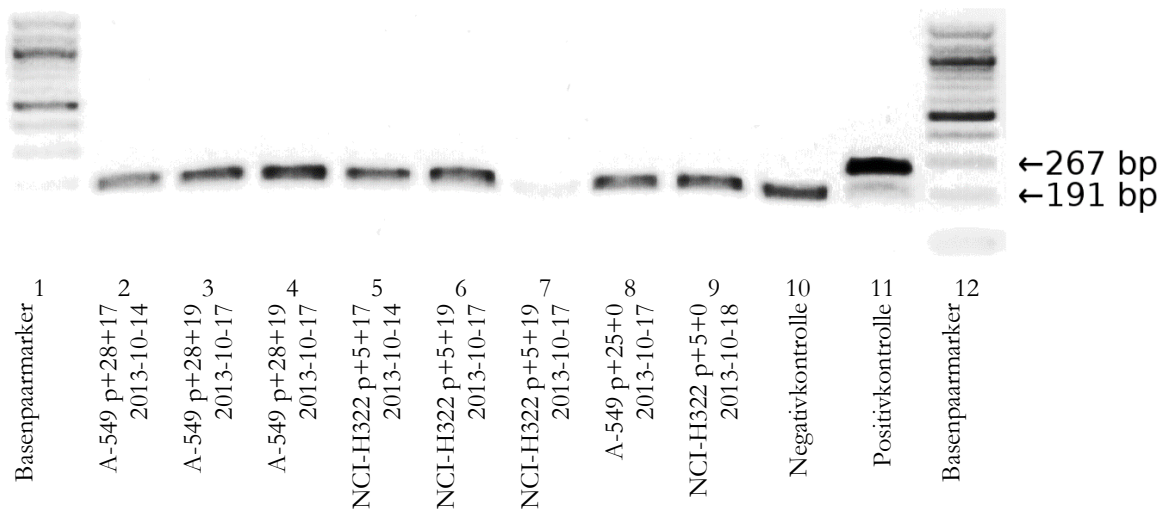


Abbildung 7: Ergebnis der PCR vom 2013-10-22. Die Fotografie zeigt DNA-Amplifikationsprodukte der Zelllinien A-549 und NCI-H322 unterschiedlicher Passagenummern, eine Positiv- und eine Negativkontrolle, sowie einen Basenpaarmarker als seitliche Begrenzung und zur Größenordnung der DNA-Amplifikationsprodukte nach der Auftrennung in einem 2%-Agarosegel. Alle DNA-Amplifikationsprodukte und die Negativkontrolle zeigen eine Bande bei 191 bp. Die Positivkontrolle weist zudem eine weitere Bande bei 267 bp auf. Die Größenordnung erfolgte über die einzelnen spezifischen Fragmentbanden des Basenpaarmarkers.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis von PCR-Testansätzen der Zelllinien NCI-H322 und A-549, einer Negativ- und einer Positivkontrolle, sowie eine seitliche Begrenzung durch einen Basenpaarmarker. Die PCR-Testansätzen der Zelllinien und die Negativkontrolle zeigen als Ergebnis eine Bande bei 191 bp mit Intensitätsschwankungen in der farblichen Ausprägung. Die Positivkontrolle weist zwei Banden bei 191 bp und 267 bp auf. Der Basenpaarmarker zeigt weitere spezifische Banden.

2.2.1.6 Wachstumskurven

Für die Wachstumskurven werden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsoberfläche von 25 cm² ausgestreut. Die Zellzahlbestimmungen erfolgt jeweils in Mehrfachbestimmung nach fünf bzw. vier unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Bei NCI-H322 betrug die Ausgangskonzentration $21 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ und die Messzeitpunkte lagen bei 21 h 30 min, 45 h 30 min, 69 h 30 min und 93 h 30 min. Bei A-549 betrug die Ausgangskonzentration $32 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$ und die Messzeitpunkte lagen bei 20 h, 24 h 35 min, 28 h, 44 h und 48 h.

Für die Zellzahlbestimmung werden die Zellen am jeweiligen Messzeitpunkt mit 1 mL einfachkonzentrierter PBS-Lösung gespült. Die PBS-Lösung wird dekantiert. Durch Zugabe von 1 mL 0,25%-Trypsinlösung wird der Verdau gestartet. Unter dem Mikroskop wird das Ablösen des Zellverbandes verfolgt. Nach dem Übergang in eine Zellsuspension wird der Verdau durch Zugabe von 2 mL Gebrauchsmedium gestoppt. Dann wird die Zellsuspension in

ein Sarstedt-Röhrchen überführt und für sechs Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig und unter Sicht auf das Pellet dekantiert und verworfen. Das Pellet wird durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst und in 2 mL Gebrauchsmedium resuspendiert.

Es wird dreimal unabhängig voneinander jeweils 10 µL Zellsuspension entnommen und mit Hilfe einer Thoma-Zellzählkammer die Gesamtzellzahl bestimmt. Für die Wachstumskurve wird der Mittelwert (MW) aus den drei Zählungen zu jedem Messzeitpunkt gegen die Zeit in einem Graphen aufgetragen.

2.2.2 Versuchsaufbau

Die verschiedenen Zellkulturversuche werden in der *log*-Phase des Zellvermehrungszyklus der jeweiligen Zellkultur durchgeführt. Aufgrund der in dieser Phase nicht limitierten Wachstumsbedingungen wird das Maximum einer konstanten Zellteilungsrate möglich, in der die Zellzahl exponentiell wächst. Dieser Zeitraum ermöglicht in Versuchen vergleichbare und zuverlässige Resultate (Nultsch 2001, S. 388; Gstraunthaler und Lindl 2013, S. 314 ff.). Zu dem Zeitpunkt liegen die Zelllinien in einem subkonfluenten Wachstumszustand (> 80 %) vor.

Um die verschiedenen Nanomaterialproben (CNH-A, CNH-B, CdSe/CdS-NaSt) in den beiden Zelllinien (NCI-H322 und A-549) über die Zytotoxizitätstests (Neutralrottest und WST-1-Test) auf eine mögliche Zytotoxizität zu untersuchen, wird von den Nanomaterialproben jeweils direkt vor Versuchsbeginn eine Stammlösung mit definierter Ausgangskonzentration angefertigt. Aus der Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe mit acht Verdünnungsstufen der zu untersuchenden Konzentrationen durch Zugabe von Stammmedium hergestellt. Wie aus Vorversuchen zum Lösungsverhalten der Nanomaterialien ersichtlich wurde, trat ein reproduzierbarer zytotoxischer Effekt erst ab einer bestimmten Konzentration der Nanomaterialien bei beiden Zelllinien in den Zytotoxizitätstests auf. Zudem sollte eine Vergleichbarkeit mit anderen Arbeitsgruppen hergestellt werden. Auf Grund der Tatsache, dass die zu untersuchenden Proben innovative Materialien waren, lag eine Limitierung der Menge vor. Bei den CNH gab es eine Empfehlung zur Aufbereitung eine maximale CNH-Konzentration von 1200 µg/mL nicht zu überschreiten.

Von jeder Probenkonzentration wird innerhalb einer Testreihe mindestens eine Fünffach-Bestimmung angefertigt. Es werden mindestens zwei unabhängige Testreihen pro Zytotoxizitätstest mit der gleichen Nanomaterialprobe durchgeführt.

2.2.2.1 Herstellung der CNH-Proben

Die CNH-Stammlösung wird mit DMSO auf eine Konzentration von 2 mg/mL eingestellt. Bei 30 Kavitäten zu je 100 µL Volumen werden 4 mg CNH-Pulver auf der Analysenwaage in ein Reagenzglas mit Schraubgewindedeckel eingewogen. Das Reagenzglas wird mit seinem Deckel verschlossen und mit 70%-Ethanollösung von außen desinfiziert. Unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank werden 30 µL DMSO als Lösemittel hinzu pipettiert. Anschließend werden 1970 µL entionisiertes H₂O hinzugefügt, sodass eine DMSO-Volumenkonzentration

von 1,5 % v/v in der gesamten Lösung vorliegt. Diese wird vorsichtig auf dem Vortex homogenisiert. Mit bloßem Auge enthält die CNH-Stammlösung sichtbare Präzipitate. Auch der Arbeitsgruppe von Miyawaki et al. (2008) fielen ab einer bestimmten Konzentration von CNH Präzipitate auf (Miyawaki et al. 2008). Der Deckel wird zusätzlich mit Parafilm verschlossen und das Reagenzglas für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um eine weitgehende Homogenisierung herzustellen und zu gewährleisten, dass die CNH-Partikel möglichst gleichmäßig verteilt vorliegen. Im Anschluss wird durch eine zügige Weiterverarbeitung der Suspension sichergestellt, dass keine erneuten Präzipitate auftreten.

Die acht CNH-Proben mit Konzentrationen im Bereich von 5 – 1000 µg/mL werden mit einer Verdünnungsreihe aus der CNH-Stammlösung durch Zugabe von Stammmedium hergestellt (Tabelle 5).

Beispielrechnung für die Ermittlung des benötigten Volumens der CNH-Stammlösung (V_{SL}) bei einer Konzentration der CNH-Stammlösung von $c_{SL} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ zur Herstellung der angestrebten CNH-Probenkonzentration $c_{soll} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ und einem Gesamtvolumen von $V_{soll} = 800 \mu\text{L}$:

$$V_{soll} = 800 \mu\text{L}, c_{soll} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}, c_{SL} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \hat{=} 2000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$c_{SL} \cdot V_{SL} = c_{soll} \cdot V_{soll}$$

$$V_{SL} = \frac{c_{soll} \cdot V_{soll}}{c_{SL}} = \frac{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 800 \mu\text{L}}{2000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 400 \mu\text{L}$$

Alle weiteren Verdünnungsstufen werden analog hergestellt. Eine exemplarische Übersicht bietet Tabelle 5.

In den einzelnen Verdünnungsstufen wird als maximale DMSO-Volumenkonzentration 0,75 % v/v bei einer CNH-Probenkonzentration von 1000 µg/mL erreicht.

Die CNH-Probenkonzentration ist identisch zur angestrebten CNH-Konzentration in einer Verdünnungsstufe.

Tabelle 5: CNH-Verdünnungsreihe

c_{soil} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	V_{SL} [μL]	V_{Med} [μL]
1000	400	400
800	320	480
600	240	560
400	160	640
200	80	720
100	40	760
10	4	796
5	2	798

c_{soil} = angestrebte CNH-Probenkonzentration, V_{SL} = Volumen CNH-Stammlösung, V_{Med} = Volumen Stammmedium

Jede Verdünnungsstufe wird für ein Gesamtvolumen von $V_{\text{soil}} = 800 \mu\text{L}$ berechnet. Die Konzentration der CNH-Stammlösung beträgt $c_{\text{SL}} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Die angestrebte CNH-Probenkonzentration (c_{soil}) variiert von 5 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Verdünnungsstufen). Bei der Ermittlung des Volumens an Stammmedium (V_{Med}) wird vom Gesamtvolumen (V_{soil}) das Volumen an CNH-Stammlösung (V_{SL}) der jeweiligen Verdünnungsstufe subtrahiert. Gemäß der jeweiligen CNH-Verdünnungsstufe wird das benötigte Volumen aus der CNH-Stammlösung (V_{SL}) und dem Stammmedium (V_{Med}) zusammenpipetiert.

2.2.2.2 Herstellung der CdSe/CdS-NaSt-Proben

Die CdSe/CdS-NaSt werden als Lösungen mit Konzentrationen von 2,5 g/L bzw. 4,1 g/L und einem pH-Wert von etwa 13 bezogen. Ohne weitere äußere Einflüsse kommt es weder zu Agglomeraten noch zu Sedimentbildungen. Diese Lösung kann auch kurzzeitig im Ultraschallbad behandelt werden. Jegliche Veränderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration der Lösung könnte zu einer Destabilisierung der kolloidalen Lösung und zu Agglomerationen führen. Die Verdünnung erfolgt mittels 0,1-molarer KOH-Lösung auf eine Konzentration von der doppelten maximalen angestrebten Probenkonzentration innerhalb der Verdünnungsreihe (Stammlösung). Anschließend wird die Stammlösung mit 1-molarer HCl-Lösung auf pH 8 eingestellt. Danach wird nach festgelegtem Schema eine Verdünnungsreihe generiert. Die pH-Wert-Einstellung wird kurz vor Versuchsbeginn durchgeführt und muss bei der Berechnung der tatsächlichen CdSe/CdS-NaSt-Konzentration (Verdünnungsstufe) der Verdünnungsreihe berücksichtigt werden. Die Abweichung jeder CdSe/CdS-NaSt-Konzentration einer Verdünnungsstufe von ihrer Zielkonzentration resultiert aus der notwendigen pH-Wert-Einstellung. Durch die unabhängigen Testreihen entstehen Konzentrationsbereiche jeder Zielkonzentration, da bei jeder Wiederholung zunächst die Verdünnung hergestellt wird und anschließend erst die pH-Wert-Einstellung erfolgt. Daher schwanken die untersuchten Konzentrationen zwischen den Wiederholungen und lassen sich nicht diskreten Konzentrationen zuordnen.

Beispielrechnung zur Herstellung der CdSe/CdS-NaSt-Stammlösung vom 2013-12-03:

$$V_{\text{soll}} = 1000 \mu\text{L}, c_{\text{soll}} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}, c_{\text{ist}} = 4,1 \frac{\text{g}}{\text{L}} \triangleq 4100 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$c_{\text{ist}} \cdot V_{\text{ist}} = c_{\text{soll}} \cdot V_{\text{soll}}$$

$$V_{\text{ist}} = \frac{c_{\text{soll}} \cdot V_{\text{soll}}}{c_{\text{ist}}} = \frac{1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 1000 \mu\text{L}}{4100 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} = 244 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{KOH}} = V_{\text{soll}} - V_{\text{ist}} = 1000 \mu\text{L} - 244 \mu\text{L} = 756 \mu\text{L}$$

Für die CdSe/CdS-NaSt-Stammlösung mit einem Gesamtvolumen von $V_{\text{soll}} = 1000 \mu\text{L}$ und einer angestrebten Probenkonzentration von $c_{\text{soll}} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ werden $244 \mu\text{L}$ der CdSe/CdS-NaSt-Lösung $4,1 \text{ g/L}$ und $756 \mu\text{L}$ $0,1$ -molare KOH-Lösung (V_{KOH}) benötigt.

Tabelle 6: Verdünnungsreihe der CdSe/CdS-NaSt vom 2014-12-04

c_{soll} [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	V_{SL} [μL]	V_{Med} [μL]	C_{ist} [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
500	300	300	495,37
350	214,3	385,7	346,78
250	150	450	247,69
125	107,1	492,9	123,85
100	53,6	546,4	99,08
60	42,9	557,1	59,45
30	21,4	578,6	29,72
10	4,3	595,7	9,91

c_{soll} = angestrebte CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration, V_{SL} = Volumen CdSe/CdS-NaSt-Stammlösung, V_{Med} = Volumen Stammmedium, c_{ist} = tatsächliche CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration, Gesamtvolumen jeder Verdünnungsstufe $V_{\text{soll}} = 600 \mu\text{L}$

Die Konzentration der CdSe/CdS-NaSt-Stammlösung betrug 1 mg/L vor der pH-Wert-Einstellung mit $0,1$ -molarer HCl-Lösung auf pH 8. Die angestrebte CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration der acht Verdünnungsstufen (c_{soll}) variierte von $10 - 500 \mu\text{g/mL}$. Entsprechend der angestrebten CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe wird das benötigte Volumen Stammlösung (V_{SL}) zu dem vorgelegten Stammmedium (V_{Med}) pipettiert.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgt nach festgelegtem Schema aus der Stammlösung (Tabelle 6). Das benötigte Volumen an Stammmedium wird in ein Reagenzglas vorgelegt. Jede der acht angestrebten Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe wird erst mit Stammmedium zusammen pipettiert, wenn diese im Anschluss direkt auf die zuvor von Medium abgezogene Zellsalte der Mikrotiterplatte aufgetragen wird. Die Konzentrationen der CdSe/CdS-NaSt-Proben liegen im Bereich von $10 - 500 \mu\text{g/mL}$. Bei der höchsten Verdünnungsstufe kann ein pH-Wert von bis zu 8 erreicht werden, da sie aus einer 1:1-Verdünnung mit Stammlösung resultiert.

Alle folgenden Verdünnungsreihen der CdSe/CdS-NaSt wurden aus einer Stammlösung nach diesem festgelegten Schema generiert. Jede hergestellte Verdünnungsstufe wurde auf die jeweilig angestrebte CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration eingestellt. Die tatsächlichen CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen ergaben sich daraus. Diese wichen infolge der pH-Wert-Einstellung auf pH 7 – 8 leicht von den angestrebten Probenkonzentrationen ab (Tabelle 6), sodass eine punktgenaue Reproduzierbarkeit nicht möglich war.

Auf Grund starker Sprünge der Messwerte zwischen untersuchten Probenkonzentrationen wurden bei den Wiederholungen die Auswahl der Probenkonzentration angepasst, um eine feinere Auflösung in den Messwerten zu erhalten.

2.2.2.3 Herstellung der Liganden-Proben MPA und MeOH

Die MPA-Lösung hat eine Konzentration von 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pH-Wert 2,5 – 3). Für den Versuch wird eine MPA-Stammlösung hergestellt. Dazu wird ein definiertes Volumen der MPA-Lösung mit 0,1-molarer KOH-Lösung mittels 1:1 Verdünnung zusammen pipettiert. Anschließend wird die MPA-Stammlösung mit 1-molarer HCl-Lösung auf pH 8 eingestellt. Bei der höchsten MPA-Verdünnungsstufe innerhalb einer Verdünnungsreihe wird ein pH-Wert von bis zu 8 erreicht.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe des Liganden MPA vom 2014-06-16

c_{soll} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	V_{SL} [μL]	V_{Med} [μL]	c_{ist} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
280	300	300	115,5
140	150	450	57,7
70	75	525	28,9
35	37,5	562,5	14,4

c_{soll} = angestrebte MPA-Probenkonzentration, V_{SL} = Volumen MPA-Stammlösung, V_{Med} = Volumen Stammmedium, c_{ist} = tatsächliche MPA-Konzentration

Eine Verdünnungsreihe für ein Gesamtvolumen $V_{\text{soll}} = 600 \mu\text{L}$ wird berechnet. Die vier MPA-Verdünnungsstufen mit den Probenkonzentrationen variieren von 35 – 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Entsprechend der jeweiligen Zielkonzentration wird das benötigte Volumen aus der MPA-Stammlösung (V_{SL}) direkt zu dem vorgelegten Stammmedium (V_{Med}) pipettiert.

Eine Verdünnungsreihe wird analog zum Beispiel in Tabelle 7 hergestellt. Nach der pH-Wert-Einstellung wird die tatsächliche MPA-Konzentration berechnet und als Grundlage für anschließende Verdünnungsstufen verwendet. Die Unterschiede in den tatsächlichen Konzentrationen ergeben sich aus der Variabilität, die sich aus der Einstellung des pH-Wertes ergibt und somit eine punktgenaue Reproduzierbarkeit nicht möglich macht.

Beim Liganden MeOH erfolgte keine pH-Wert-Einstellung der MeOH-Stammlösung. Für die MeOH-Verdünnungsreihe wurde ein zu den MPA-Verdünnungsstufen analoges Volumen genutzt.

2.2.2.4 Aussaat und Behandlung der Zellen

Entsprechend der laborinternen Erfahrungswerte für das Ausstreuen der Zelllinien (siehe 2.2.1) werden je Kavität einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte 200 μ L Zellkultur mit der entsprechenden Zellkonzentration pipettiert. Die zwölfte Spalte diente als photometrischer Leerwert (*blank*) und bleibt für den WST-1-Test frei von Zellen.

Die Mikrotiterplatte wird bei der NCI-H322-Zelllinie für 48 Stunden und bei der A-549-Zelllinie für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5-%-CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Subkonfluenz muss bei der anschließenden lichtmikroskopischen Prüfung bei über 80 % liegen.

Die Zellen auf einer Mikrotiterplatte werden pro Kavität mit den Proben oder den Kontrolllösungen bestückt. In den Testreihen dient als Positivkontrolle (PK) eine 20-%-DMSO-Lösung und als Negativkontrollen (NK) wird reines Medium benutzt. Bei den CNH-Testreihen wird als zusätzliche Negativkontrolle (NK-0,75%-DMSO) eine 0,75-%-DMSO-Lösung eingesetzt. Bei den Testreihen mit den CdSe/CdS-NaSt sowie bei den Ligandentestreihen resultieren die zusätzlichen Negativkontrollen (NK-pH) auf pH 7,5 – 8 eingestelltem Stammmedium.

Nach einem experimentell festgelegten Schema wird die Lösung in den Kavitäten ersetzt. Zuerst wird der Rahmen (Reihe A, G und H) mit 100 μ L Stammmedium je Kavität belegt. Anschließend wird das Gebrauchsmedium spaltenweise von 5 Kavitäten abgezogen und durch 100 μ L der entsprechenden Proben- bzw. Kontrolllösung ersetzt. Begonnen wird bei Kavität B1 und bis einschließlich Kavität F12 weitergearbeitet. Die Kavitäten B12 bis F12 für den Leerwert (*blank*) enthalten beim WST-1-Test Stammmedium und keine Zellen und beim Neutralrottest PBS und Zellen.

Für die Versuche mit CNH zeigt Tabelle 8 beispielhaft die Mikrotiterplattenbelegung im WST-1-Test. Die Mikrotiterplattenbelegung im Neutralrottest erfolgte analog.

Tabelle 8: Mikrotiterplattenbelegung im WST-1-Test am Beispiel CNH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Stammmedium											
B	PK	1000 μ g/mL Probe	800 μ g/mL Probe	600 μ g/mL Probe	400 μ g/mL Probe	200 μ g/mL Probe	100 μ g/mL Probe	10 μ g/mL Probe	5 μ g/mL Probe	NK-0,75%- DMSO	NK-Medium	NK-Medium ohne Zellen
C												
D												
E												
F												
G												
H	Stammmedium											

Mikrotiterplattenbelegung in horizontaler Richtung in den Kavitäten 1 bis 12 in der Reihe A, G und H mit Stammmedium. Weitere Belegung spaltenweise von der Kavität B bis F; ausgehend von der Positivkontrolle PK (20-%-DMSO-Lösung), gefolgt von der höchsten CNH-Probenkonzentration. Weitere Verdünnungsstufen wurden in absteigender CNH-Probenkonzentration aufgetragen. Im Anschluss folgen die Negativkontrollen NK-0,75%-DMSO (0,75%-DMSO-Lösung), NK-Medium (Stammmedium) und NK-Medium ohne Zellen (Stammmedium).

Zum Testen von zwei unterschiedlichen Liganden auf derselben Mikrotiterplatte wird diese wie in Tabelle 9 dargestellt belegt, um Kontaminationen zu vermeiden. Beim Abziehen des Gebrauchsmediums wird die Mikrotiterplatte zweigeteilt behandelt. Das Gebrauchsmedium wird von maximal 6 Kavitäten in Folge abgezogen mit Beginn in Reihe B. Hierbei wird bei B6 begonnen und in Richtung B1 weitergearbeitet. Danach werden jeweils 100 μL der entsprechenden Verdünnungsstufe pro Kavität pipettiert. Diese Vorgehensweise wird für die Reihen C6 bis F6 beibehalten. Anschließend wird die Platte gedreht und nach dem gleichen Schema mit Beginn bei B7 in Richtung B12 weiterverfahren.

Tabelle 9: Mikrotiterplattenbelegung zur Untersuchung der Liganden MPA und MeOH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Stammmedium											
B	PK	280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPA	140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPA	70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPA	35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPA	NK-pH	NK-Medium	35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MeOH	70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MeOH	140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MeOH	280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MeOH	NK-Medium ohne Zellen
C												
D												
E												
F												
G	Stammmedium											
H	Stammmedium											

Eine Mikrotiterplatte wird für die Ligandenuntersuchung MPA und MeOH in horizontaler Richtung in den Kavitäten 1 bis 12 in der Reihe A, G und H mit Stammmedium belegt. Die weitere Belegung erfolgt spaltenweise von der Kavität B bis F, beginnend mit der PK, gefolgt von der höchsten MPA-Verdünnungsstufe. Weitere Verdünnungsstufen werden in absteigender MPA-Konzentration aufgetragen. Die Spalte B6 bis F6 wird mit der NK-pH belegt. Im Anschluss folgen die NK-Medium und der Ligand MeOH in aufsteigender Konzentration. Die abschließende Spalte B 12 bis F 12 enthält NK-Medium ohne Zellen.

Nach der Bestückung der Mikrotiterplatte mit den Proben, folgt eine Inkubation bei 37 °C und 5-%-CO₂-Atmosphäre für 24 Stunden. Anschließend wird die Zellvitalität lichtmikroskopisch geprüft. Hiernach werden die Verdünnungsstufen und Kontrolllösungen in den Kavitäten durch die Testlösungen des jeweiligen Zytotoxizitätstest ausgetauscht. Zur Berücksichtigung des zeitlichen Faktors wird unter Beibehaltung der Richtung jeweils eine Reihe, mit Beginn bei der Kavität B12 (Leerwert) und in Richtung auf B1 (PK) Lösung von den Zellen abgezogen. Um Messfehler durch Probenrückstände zu vermeiden, werden die Kavitäten mit CNH-Proben vor dem Verwerfen der Lösung mehrfach mit ihrem Inhalt gespült. Bei den CdSe/CdS-NaSt-Proben werden die Zellen einmalig gespült. Die Testlösungen werden reihenweise hinzugegeben.

2.2.2.5 Auswertung der durchgeführten Experimente

Die Messergebnisse der Absorptionsmessung im Photometer werden mit der Software *Tecan Magellan* zur Weiterverarbeitung mit *Microsoft Excel* bereitgestellt. Im Folgenden werden ausschließlich die von *Magellan* als Differenzdaten ausgegebenen Messwerte genutzt.

In einem ersten Schritt werden die Rohdaten um den versuchsbedingten Anteil bereinigt, der nicht durch Schadstoffe verursacht wurde. Dazu wird von den Messwerten der Proben und den

NK der MW eines Messwertes abgezogen, bei dessen Messung keine lebenden Zellen vorliegen, der angestrebte Messwert also bei null lag. Beim WST-1-Test ist dies der Leerwert (NK-Medium ohne Zellen), beim Neutralrottest die PK.

Als Referenzwert mit einer Zellviabilität von 100 Prozent wird die NK mit 0,75%-DMSO-Lösung bei den CNH und die NK-pH bei den CdSe/CdS-NaSt genutzt.

Anschließend wird die Zellvitalität [%] oder die mitochondriale Aktivität [%] in Bezug zum Referenzwert aller Probenmesswerte ermittelt (Gstraunthaler und Lindl 2013).

OD_{VS} = Optische Dichte der Verdünnungsstufe, OD_{PK} = Optische Dichte der Positivkontrolle, OD_{NK} = Optische Dichte der Negativkontrolle

$$\text{Zellvitalität [\%]} = \frac{OD_{VS} - OD_{PK}}{OD_{NK} - OD_{PK}} \cdot 100$$

Für die Auswertung werden die einzelnen Messwerte des jeweiligen Versuchs in einem Graphen aufgetragen und die MW und Standardabweichung ermittelt.

Die mittlere effektive Wirkstoffkonzentration (EC_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]), bei der eine fünfzigprozentige Hemmung der Zellvitalität und/oder der mitochondrialen Aktivität nach der Expositionszeit vorliegt, wird mittels vierparametrischer, nichtlinearer Kurvenanpassung (DoseRespond) durch eine sigmoidale Regressionskurve mit der Software *Origin* ermittelt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Bewertung der Hemmung und Einstufung der Zytotoxizität anhand der Zellvitalität oder der mitochondrialen Aktivität über die in Tabelle 10 aufgeführten Einstufungen beschrieben.

Tabelle 10: Bewertung der Hemmung und Einstufung der Zytotoxizität

Zellvitalität [%] oder mitochondriale Aktivität [%]	Hemmung	Zellreaktion
≥ 90	keine Hemmung	nicht zytotoxisch
70 – 89	schwache Hemmung	mild zytotoxisch
50 – 69	mäßige Hemmung	mäßig zytotoxisch
30 – 49	starke Hemmung	stark zytotoxisch
0 – 29	sehr starke Hemmung	sehr stark zytotoxisch

Die Tabelle führt in ihrer linken Spalte eine Einstufung der Zellvitalität oder der mitochondrialen Aktivität in % auf. Die mittlere Spalte beschreibt die jeweilige Hemmung in Abhängigkeit zur Zellvitalität oder zur mitochondrialen Aktivität. Die rechte Spalte dient der Interpretation der Zytotoxizität in Abhängigkeit zur Hemmung.

2.2.2.6 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche dieser Arbeit erfolgte mit den Suchmaschinen PubMed und Google fortlaufend. Zur Berücksichtigung verwandter Arbeiten wurde am 2021-01-03 PubMed mittels folgender Begriffe durchsucht: *carbon nanoborns/CNH toxicity*, *carbon nanoborns/CNH lung toxicity*, *carbon nanoborns/CNH cytotoxicity*, *carbon nanoborns/CNH respiratory system*, *carbon nanoborns/CNH inhalation*, *carbon nanoborns toxicity NCI-H322/A-549*, *carbon nanomaterial Lung toxicity*, *carbon nanomaterial cytotoxicity inhalation*, *carbon nanomaterial toxicity Lung*, *carbon nanomaterial toxicity inhalation A-549*, *carbon nanomaterial toxicity NCI-H322/A-549*, *A-549 carbon nanomaterial*, *CdS/CdSe Lung toxicity*, *quantumrods CdS/CdSe toxicity*, *CdS/CdSe toxicity*, *quantumrods CdSe/CdS toxicity*.

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden die zwei CNH-Fractionen und die CdSe/CdS-NaSt in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und eine grafische Auswertung der Zellvitalität bzw. der mitochondrialen Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration erstellt. In den Hauptversuchen wurden darüber zur weiteren Klassifizierung die EC_{50} -Werte ermittelt. Voraussetzung zur Auswertung der Versuche waren erfolgreiche Neutralrottest- und WST-1-Test-Färbungen. Alle Graphen basieren auf Messwerten, die im Anhang zu finden sind.

3.1 Vorversuche

Für die Behandlung der Zelllinien mit den zu untersuchenden Nanopartikeln CNH und CdSe/CdS-NaSt wurde zunächst eine Kalibrierung der Versuchsparameter durchgeführt. Dazu mussten die Einflüsse der verschiedenen Rahmenbedingungen (Lösungsmiteleinsetz, pH-Wert, Expositionszeit), die zur Verarbeitung der Nanopartikel und optimalen Versuchsdurchführung nötig waren, bestimmt werden. Damit die Zellen sich in der optimalen Wachstumsphase während der Versuche befinden, wurde von jeder Zellreihe eine Wachstumskurve angefertigt.

3.1.1 Lösungsmiteleinfluss

Mit den Vorversuchen sollte gezeigt werden, ob das verwendete Lösungsmittel DMSO, das zur Suspensionsherstellung für die CNH benutzt wurde, einen Einfluss auf die Zellvitalität und die mitochondriale Aktivität hatte. Dazu wurden mit DMSO Verdünnungsreihen hergestellt und die zwei Zelllinien NCI-H322 und A-549 nach ihrer Anzucht auf Mikrotiterplatten damit behandelt.

Abbildung 8 stellt die MW der Zellvitalität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinie NCI-H322 in Abhängigkeit zur DMSO-Volumenkonzentration [% v/v] im Neutralrottest dar.

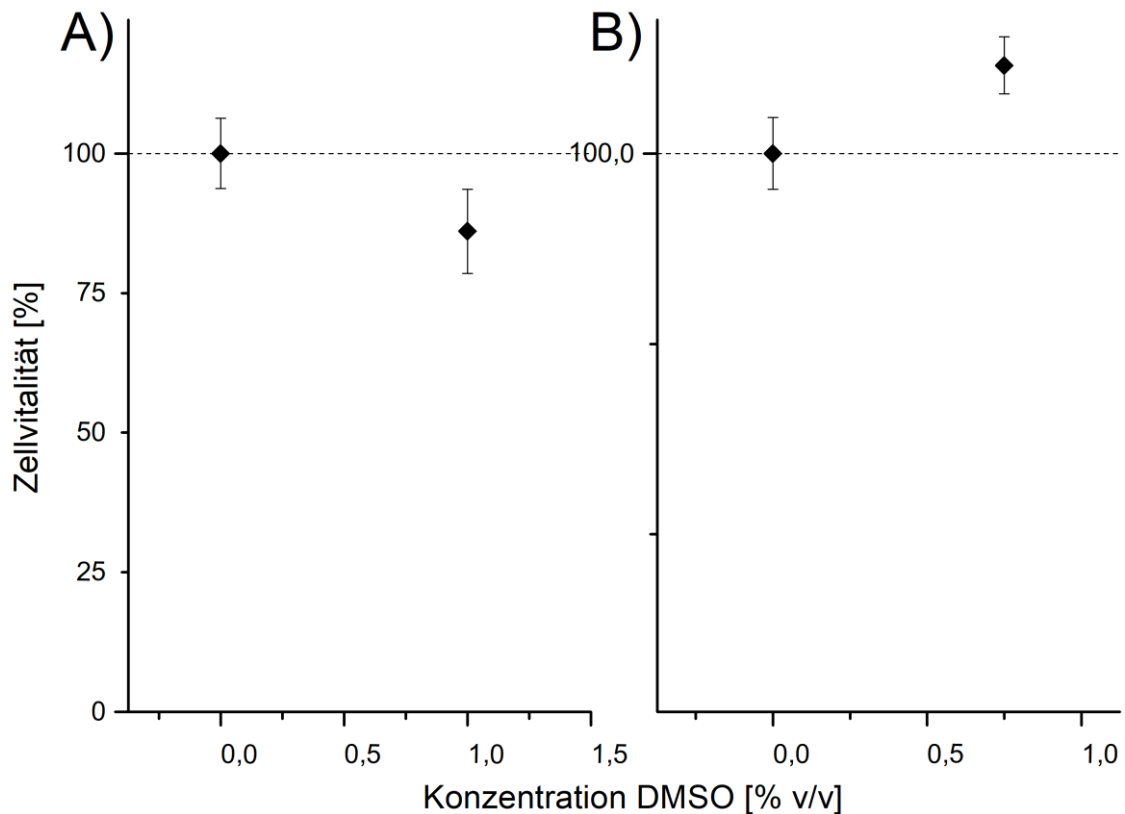


Abbildung 8: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest bei der Zelllinie NCI-H322 in Abhängigkeit zur DMSO-Volumenkonzentrationen [% v/v]. Die Graphen bilden Zellvitalitäten bei DMSO-Volumenkonzentrationen 0,00 % v/v und 1,00 % v/v (A) und 0,00 % v/v und 0,75 % v/v (B) ab und resultieren aus einer unabhängigen Testreihe mit jeweils 10 Replikaten pro Probenkonzentration. Bei A nimmt die Zellvitalität ab. Bei den Ergebnissen in B ist keine Tendenz erkennbar.

Die Probenkonzentrationen mit einer 0,00 % v/v DMSO-Volumenkonzentration wurden als NK gewertet. Sie wiesen einen MW der Zellvitalität von 100 % auf. Der Neutralrottest zeigte bei der NCI-H322-Zelllinie und der DMSO-Volumenkonzentration 1,00 % v/v (Abbildung 8 A) einen MW der Zellvitalität von 85,63 %. Bei der 0,75 % v/v DMSO-Volumenkonzentration (Abbildung 8 B) resultierte ein MW der Zellvitalität von 115,80 % (Anhang Tabelle A.1; Versuchsdaten: A) 2013-09-12 und B) 2014-02-13).

Bei einer DMSO-Volumenkonzentration von 1,0 % v/v nahm die Zellvitalität der Zelllinie NCI-H322 um fast 15 % ab. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde für die Folgeversuche dieser Arbeit eine DMSO-Volumenkonzentration von 0,75 % v/v gewählt, bei der in der unabhängigen Verdünnungsreihe (Abbildung 8 B) keine Einschränkung der Zellvitalität nachgewiesen wurde und die für beide Zelllinien in vergleichbarer Weise anwendbar war.

Zur Sicherstellung, dass in den folgenden Hauptversuchen mit den CNH keine Lösungsmiteleinflüsse auftraten, wurden stets zwei Arten von NK mitgeführt. Die NK-0,75%-DMSO wurden explizit auf eine DMSO-Volumenkonzentration von 0,75 % v/v eingestellt und die NK-Medium-Ansätze (NK-Medium) enthielten Stammmedium.

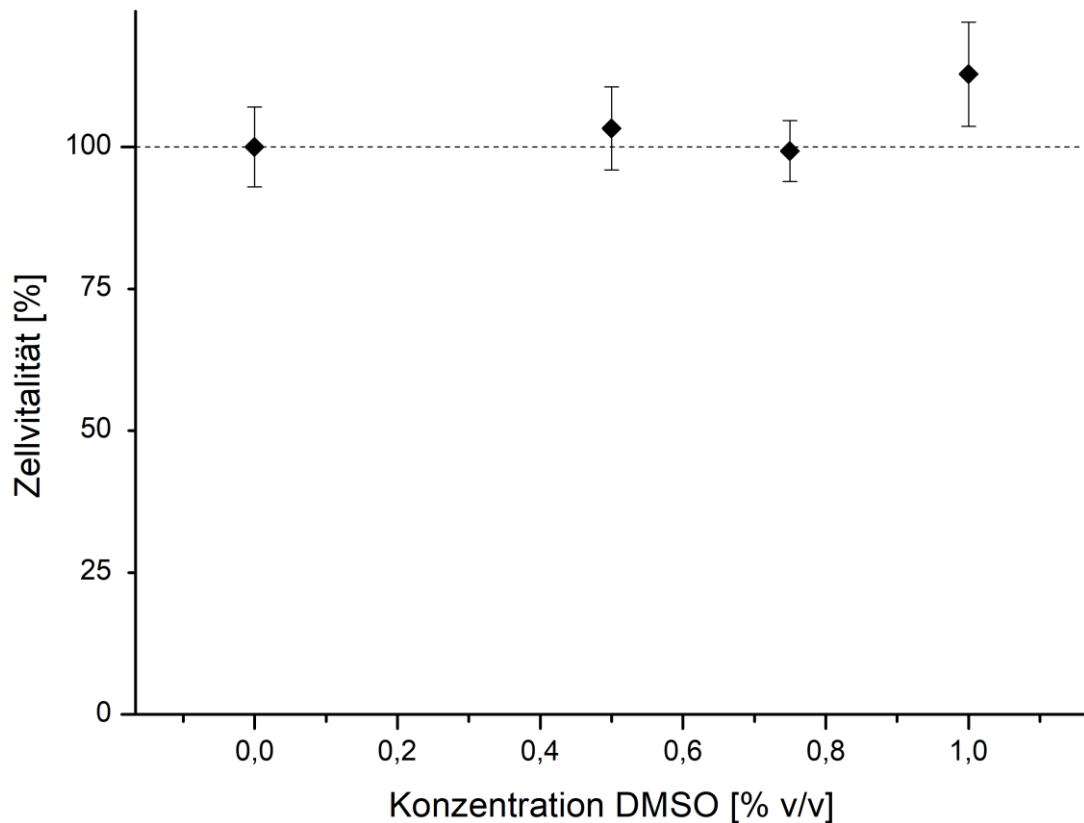


Abbildung 9: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest bei der Zelllinie A-549 in Abhängigkeit zur DMSO-Volumenkonzentrationen [% v/v]. Der Graph bildet die Zellvitalität bei DMSO-Volumenkonzentrationen [% v/v] 0,00 – 1,00 % v/v ab und resultiert aus einer unabhängigen Testreihe mit acht Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen ist keine Tendenz der Zellvitalität erkennbar.

Abbildung 9 stellt die MW der Zellvitalität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] bei der Zelllinie A-549 in Abhängigkeit zu den DMSO-Volumenkonzentrationen 0,00 % v/v, 0,50 % v/v, 0,75 % v/v und 1,00 % v/v im Neutralrottest dar.

Bei den A-549-Zellen (Abbildung 9) zeigte der Neutralrottest keine Veränderungen in der Zellvitalität unter steigender DMSO-Volumenkonzentration. Die MW der Zellvitalität oszillierten über 99,28 % (Anhang Tabelle A.2; Versuchsdatum: 2013-02-14).

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass DMSO in den angewendeten Volumenkonzentrationen keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellvitalität der Zelllinie A-549 hat. Die maximale Volumenkonzentration an DMSO in den Probenkonzentrationen der Hauptversuche, die zur Suspensionsherstellung der CNH benötigt wurde, betrug 0,75 % v/v und lag damit unterhalb der konzentriertesten DMSO-Volumenkonzentration der Vorversuche.

3.1.2 Einfluss des pH-Wertes

Zur Herstellung der CdSe/CdS-NaSt-Suspension wird laut Hersteller ein spezifischer pH-Wert benötigt, damit die Nanopartikel einzeln dispergiert vorliegen. Daher ist für eine langfristig stabile Lagerung der CdSe/CdS-NaSt-Suspension ohne Agglomeration ein stark basischer pH-Wert von 13 nötig.

Um die Zellen mit der Suspension für den Neutralrottest und den WST-1-Test behandeln zu können, ohne eine Beeinträchtigung der Versuchsdurchführung zu erhalten, wurde der pH-Wert auf ein fast neutrales bzw. schwach basisches Niveau herabgesetzt. Zur Durchführung des Neutralrottests und des WST-1-Tests wurde ein pH-Wert 7 – 8 benötigt.

Um zu bestimmen, wie der pH-Wert hinsichtlich der Zellvitalität einzustellen ist, wurden die Zelllinien NCI-H322 und A-549 mit jeweils einer NK, deren pH-Wert auf pH 7 – 8 (NK-pH) eingestellt wurde und der NK-Medium (pH-Wert unverändert) miteinander verglichen.

Zur Sicherstellung, dass in den Testreihen mit den CdSe/CdS-NaSt der Hauptversuche keine pH-Werteinflüsse auftraten, wurden ähnlich wie in den Neutralrottests, die zwei Arten von NK mitgeführt.

Abbildung 10 zeigt vier Graphen, in denen die MW der optischen Dichte mit dazugehöriger Standardabweichung im Neutralrottest und im WST-1-Test bei den Zelllinien NCI-H322 und A-549 in Abhängigkeit von NK und NK-pH dargestellt werden (Anhang Tabelle A.3, Tabelle A.4, Tabelle A.5 und Tabelle A.6).

Im Neutralrottest haben die Testreihen der Zelllinie NCI-H322 (Abbildung 10 A) sich überschneidende Standardabweichungen der optischen Dichte zwischen den NK-pH- und NK-Proben. Bei den Testreihen 2013-09-12 und 2013-11-28 wachsen die NCI-H322-Zellen tendenziell vermehrt in den NK-pH-Proben (Testreihe 2013-09-12 und 2013-09-19: pH-Wert 7 – 7,5 und Testreihe 2013-11-28 pH-Wert 8 für NK-pH-Proben). Die Daten weisen keinen Unterschied in der optischen Dichte zwischen NK-pH- und NK-Proben bei den NCI-H322-Zellen auf (Tabelle A.3; Versuchsdaten 2013-09-12, 2013-09-19 und 2013-11-28).

Die Testreihen der Zelllinie A-549 zeigen im Neutralrottest (Abbildung 10 B) keine sich überschneidende Standardabweichungen der optischen Dichte zwischen den NH-pH- und NK-Proben (Anhang Tabelle A.5; Versuchsdaten 2013-09-24, 2013-11-27 und 2014-01-08). Bei der Testreihe 2013-09-24 haben die A-549-Zellen tendenziell höhere optische Dichtewerte in den NK-pH-Proben. Die Testreihen 2013-11-27 und 2014-01-08 zeigen höhere Zahlenwerte in der optischen Dichte bei den NK-Proben auf (Testreihe 2013-09-24: pH-Wert 7, Testreihe 2013-11-27 pH-Wert 8 und Testreihe 2014-01-08 pH-Wert 7,5 – 8 für NK-pH-Proben). Die Daten weisen einen Unterschied in der optischen Dichte zwischen allen NK-pH- und NK-Proben bei den A-549-Zellen auf.

Im WST-1-Test haben die Testreihen der Zelllinie NCI-H322 (Abbildung 10 C) keine sich überschneidende Standardabweichungen der optischen Dichte zwischen den NK-pH und NK (Anhang Tabelle A.4; Versuchsdaten 2013-11-21, 2013-12-05 und 2014-01-09). In den

Testreihen 2013-11-21 und 2013-12-05 weisen die NK-Proben höhere optische Dichtewerte auf. Somit liegt in diesen beiden Testreihen ein Unterschied in der optischen Dichte der NCI-H322-Zellen zwischen den NK-pH- und NK-Proben vor. Im dritten unabhängigen Versuch sind die optischen Dichtewerte bei den NK-Proben höher (Testreihe 2013-11-21 und 2014-01-09: pH-Wert 8 und Testreihe 2013-12-05: pH-Wert 7,5 – 8 für NK-pH-Proben).

Die Testreihen 2013-10-09 und 2013-11-20 der Zelllinie A-549 zeigen im WST-1-Test (Abbildung 10 D) keine sich überschneidenden Standardabweichungen der optischen Dichte zwischen den NH-pH- und NK-Proben (Tabelle A.6; Versuchsdaten 2013-10-09, 2013-11-20 und 2013-12-04). Bei allen Testreihen haben die A-549-Zellen höhere optische Dichtewerte in den NK-Proben. Somit liegt hier ein Unterschied in der optischen Dichte der A-549-Zellen zwischen den NK-pH- und NK-Proben vor (Testreihe 2013-10-09, 2013-11-20 und 2013-12-04: pH-Wert 8 für NK-pH-Probe).

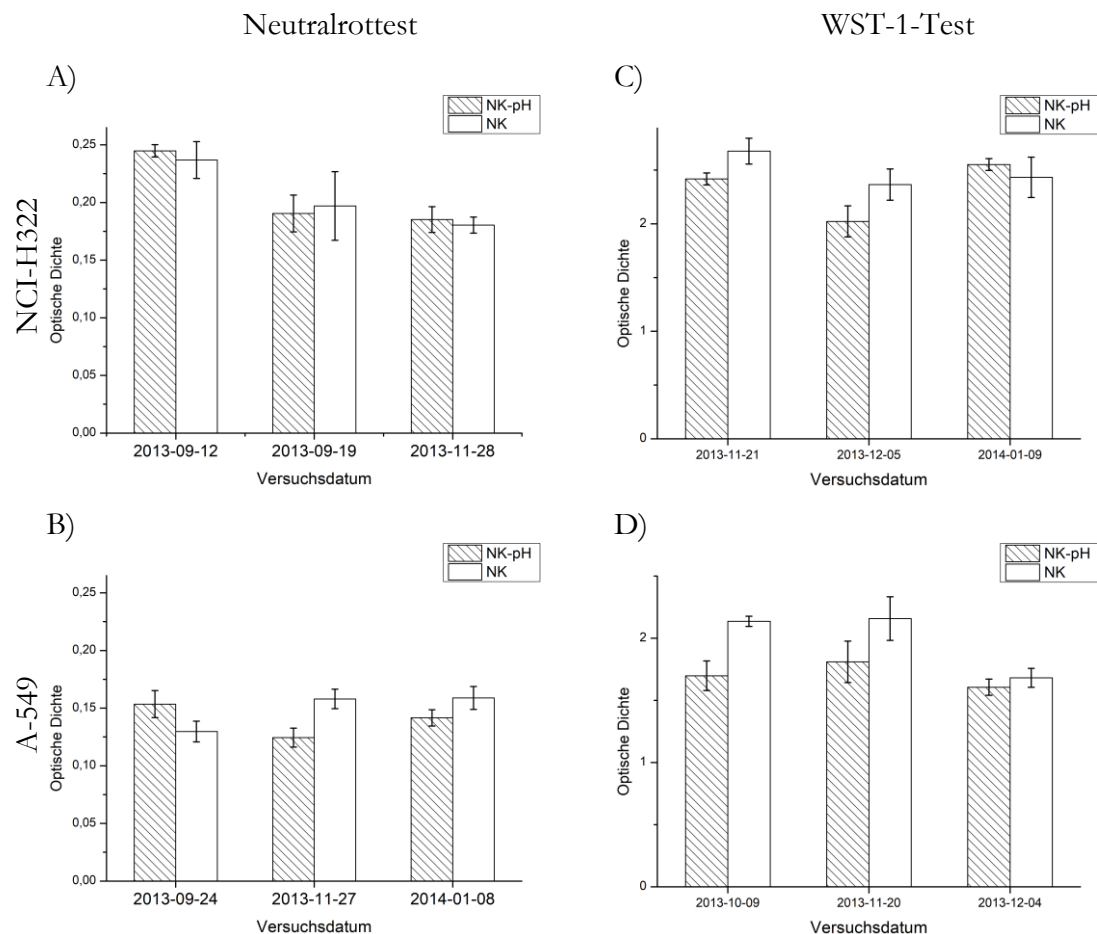


Abbildung 10: Vergleich der MW der optischen Dichte von NK und NK-pH im Neutralrottest und WST-1-Test. Die Graphen veranschaulichen die optische Dichte von NK-pH und NK im Neutralrottest (A, B) und WST-1-Test (C, D) bei den Zelllinien NCI-H322 und A-549 aus drei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten.

3.1.3 Wachstumskurve

Eine Wachstumskurve bildet sechs Phasen des Zellwachstums ab. Sie beginnt mit der *lag*-Phase, in der sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen adaptieren und das Zellwachstum beginnt, jedoch keine Zellteilungen stattfinden. An diese Phase schließt sich die Beschleunigungsphase als zweite Phase an, in der Zellteilungen zunehmend stattfinden. In der folgenden *log*-Phase, finden die Zellteilungen exponentiell statt. Es folgt die Verzögerungsphase, in der sich die Zellteilungen verlangsamen. In der stationären Phase erfolgen die Zellteilungen im selben Ausmaß wie das Absterben der Zellen. Die Abnahmephase charakterisiert sich durch eine steigende Zellabsterberate (Nultsch 2001, S. 490 f.).

3.1.3.1 NCI-H322

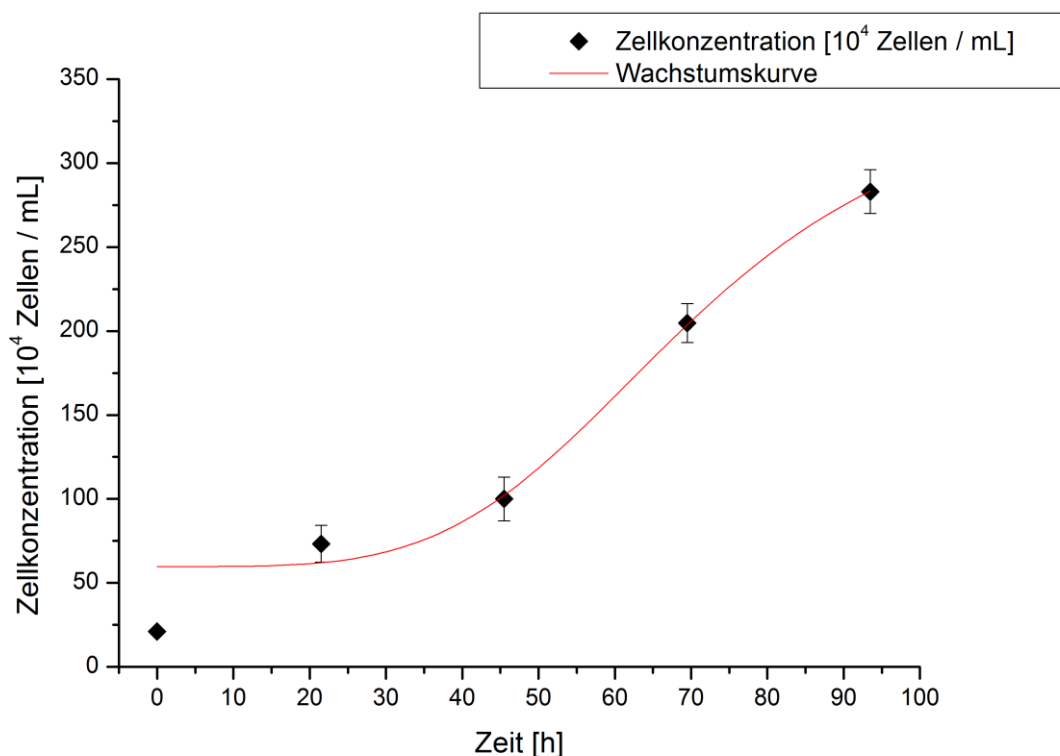


Abbildung 11: Wachstumskurve der Zelllinie NCI-H322. Die Zellkonzentration [10^4 Zellen/mL] der Zelllinie NCI-H322 wurde in Abhängigkeit zu der Zeit [h] dargestellt. Die Ausgangszellzahl betrug 21×10^4 Zellen/mL. Pro Zeitpunkt wurde die Zellkonzentration aus vier Auszählungen gemittelt.

Um die Versuche mit der Zelllinie NCI-H322 unter optimalen Versuchsbedingungen in der Expositionszeit mit den zu untersuchenden Nanomaterialien durchzuführen war es notwendig, die Testreihen in der *log*-Phase der Zellen durchzuführen. Hierzu wurde die Wachstumskurve für die Zelllinie NCI-H322 (Abbildung 11) erstellt und deren *log*-Phase ermittelt.

Nach 21,5 Stunden lag der MW der Zellkonzentration bei $73,25 \times 10^4$ Zellen/mL, nach 45,5 Stunden bei 100×10^4 Zellen/mL, nach 69,5 Stunden bei $204,75 \times 10^4$ Zellen/mL und nach 93,5 Stunden bei 283×10^4 Zellen/mL (Anhang Tabelle A.7, Versuchsdatum 2013-10-21). Es zeigte

sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Die *log*-Phase wurde über die grafische Auswertung der Zelldichte ermittelt und lag ca. bei Stunde 45 – 70 nach der Aussaat der NCI-H322-Zellen.

Um eine Vergleichbarkeit künftiger Versuchsergebnisse zu gewährleisten, wurde diese Zelllinie 48 Stunden in Mikrotiterplatten vorkultiviert, sodass sich die Zellen in der *log*-Phase der Wachstumskurve befanden, bevor sich eine ca. 24-stündige Exposition mit den Nanopartikeln anschloss.

3.1.3.2 A-549

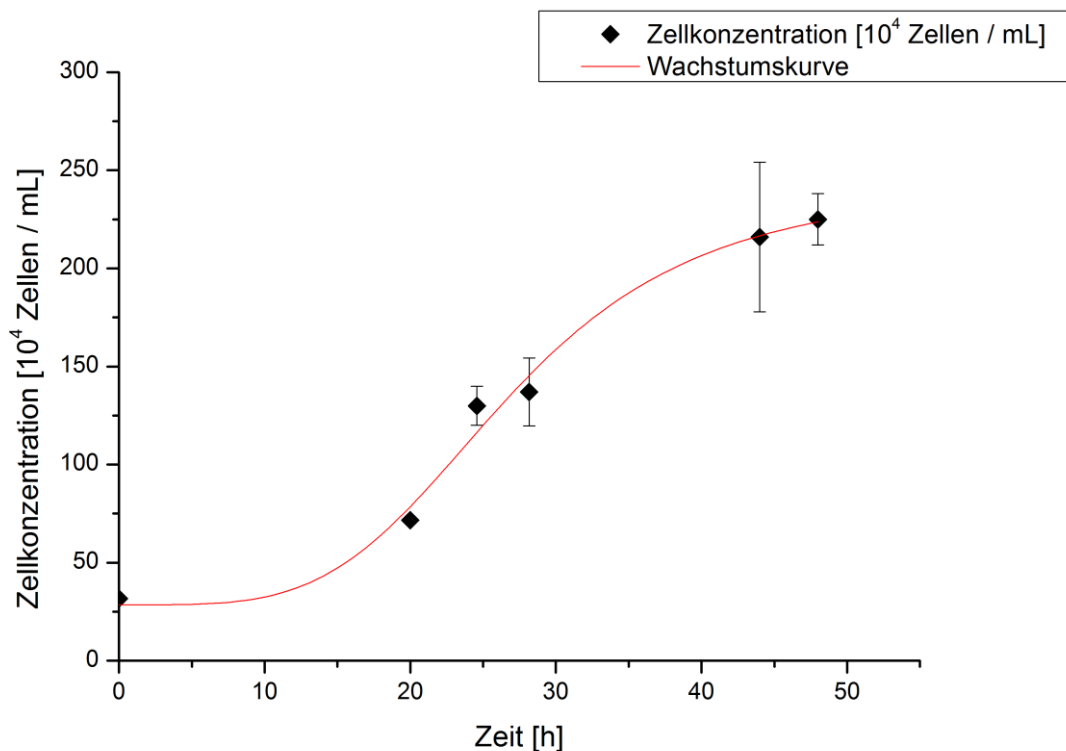


Abbildung 12: Wachstumskurve der Zelllinie A-549. Die Zellkonzentration [10^4 Zellen/mL] der Zelllinie A-549 wurde in Abhängigkeit zu der Zeit [h] dargestellt. Die Ausgangszellzahl betrug 32×10^4 Zellen/mL. Pro Zeitpunkt wurde die Zellkonzentration aus drei Auszählungen gemittelt.

Für die Zelllinie A-549 wurde eine Wachstumskurve (Abbildung 12) angefertigt. Nach 20 Stunden lag der MW der Zellkonzentration bei $71,67 \times 10^4$ Zellen/mL, nach 24,5 Stunden bei 130×10^4 Zellen/mL, nach 28 Stunden bei 137×10^4 Zellen/mL, nach 44 Stunden bei 216×10^4 Zellen/mL, nach 48 Stunden bei 225×10^4 Zellen/mL (Anhang Tabelle A.8; Versuchsdatum 2014-04-03). Anhand der grafischen Auswertung der Zelldichte lag die für die Zelllinie A-549 ermittelte *log*-Phase zwischen Stunde 20 – 35 nach der Aussaat und dauerte ca. 15 Stunden.

Um eine Vergleichbarkeit künftiger Versuchsergebnisse zu gewährleisten, wurden Zellen dieser Zelllinie 24 Stunden in Mikrotiterplatten vorkultiviert, sodass sich die Zellen in der *log*-Phase der Wachstumskurve befanden, bevor sich eine ca. 24-stündige Exposition mit den Nanopartikeln anschloss.

3.1.4 Ligandeneinfluss

Die CdSe/CdS-NaSt benötigten zur Suspensionsherstellung in hydrophiler Lösung gebundene MeOH- und MPA-Liganden auf ihrer Oberfläche. Daher wurde mit den folgenden Testreihen ermittelt, ob die Liganden einen Einfluss auf die Zellvitalität bzw. die mitochondriale Aktivität der beiden Zelllinien ausüben.

3.1.4.1 Ligand MPA

Der Ligand MPA ermöglicht bei der Suspensionsherstellung die Wasserlöslichkeit bei gleichzeitiger Vereinzelnung der Nanopartikel. Bei dem Liganden MPA handelt es sich um einen Säureliganden, der einen pH-Wert 2,5 – 3,0 aufweist.

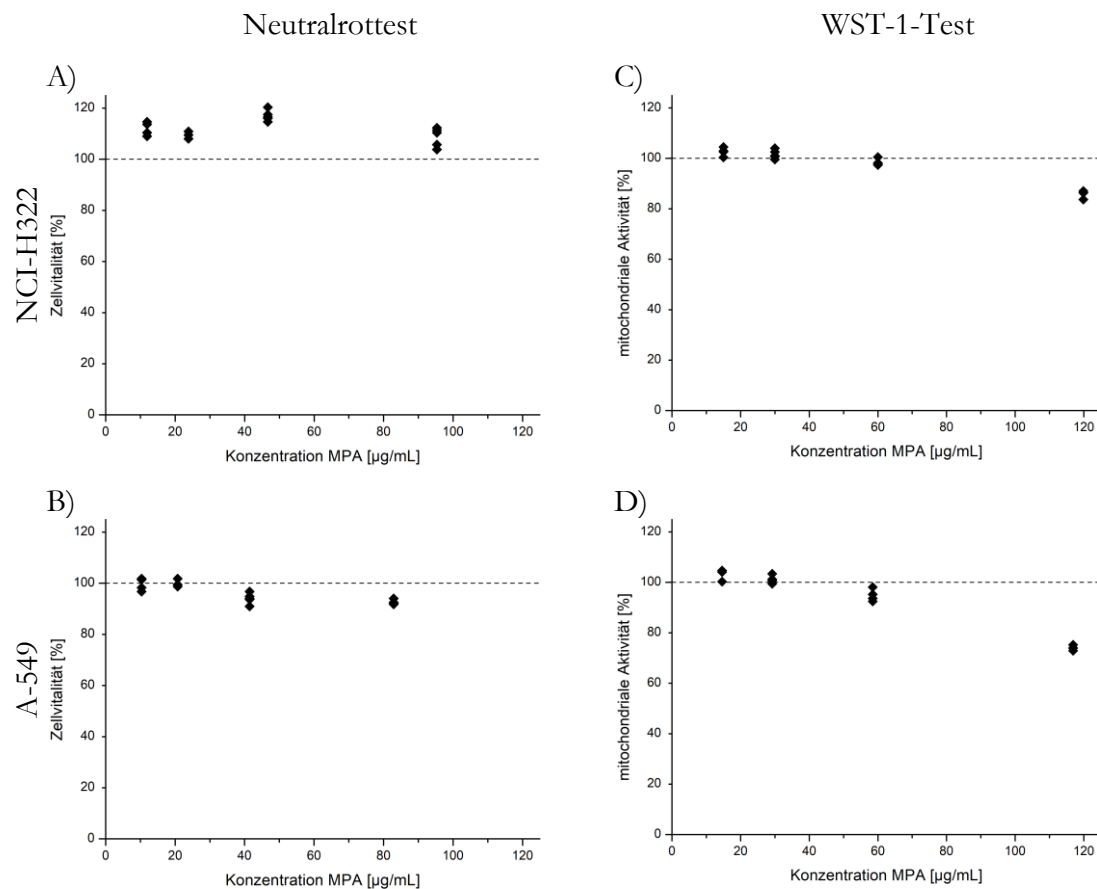


Abbildung 13: Zellvitalität [%] im Neutralrottest und mitochondriale Aktivität [%] im WST-1-Test in

Abhängigkeit zur MPA-Konzentration [µg/mL]. Die Graphen bilden die Zellvitalität (A, B) und die mitochondriale Aktivität (C, D) bei MPA-Konzentrationen im Bereich 11,92 – 95,35 µg/mL (A), 10,36 – 82,90 µg/mL (B), 15 – 119,90 µg/mL (C) und 14,60 – 116,90 µg/mL (D) ab. Und resultieren aus jeweils einer unabhängigen Testreihe mit insgesamt fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen in A und B ist keine Tendenz erkennbar. Bei C und D nehmen die mitochondrialen Aktivitäten ab.

Um zu untersuchen, ob der Ligand MPA selbst Auswirkungen auf das Wachstum der beiden Zelllinien NCI-H322 und A-549 hat, wurden die Zellen nach ihrer Kultivierung in Mikrotiterplatten mit ansteigenden MPA-Probenkonzentrationen über eine Expositionszeit von 24 Stunden exponiert (vergleiche Kapitel 2.2.2.3). Abbildung 13 zeigt 4 Graphen, in denen die ermittelte Zellvitalität [%] (A, B) und die mitochondriale Aktivität [%] (C, D) der Zelllinien

NCI-H322 (A, C) und A-549 (B, D) in Abhängigkeit zur MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im Neutralrottest (Abbildung 13 A, B) und im WST-1-Test (Abbildung 13 C, D) dargestellt wurden.

Der Neutralrottest wies bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 13 A) eine eher gleichbleibende, konstante Zellvitalität bei steigender MPA-Probenkonzentration auf. Die MW der Zellvitalität zeigten im Neutralrottest konstant Werte über 100 % auf. Die Zellvitalität oszillierte im Bereich 103,78 – 120,30 %. Die getesteten tatsächlichen MPA-Probenkonzentrationen lagen im Bereich 11,92 – 95,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Anhang Tabelle A.9; Versuchsdatum: 2014-06-20).

Der Neutralrottest zeigte bei der A-549-Zelllinie (Abbildung 13 B) eine eher konstante Zellvitalität im Bereich 90,96 – 101,78 % bei steigender MPA-Probenkonzentration auf (Anhang Tabelle A.11; Versuchsdatum 2014-06-19). Die untersuchten tatsächlichen MPA-Probenkonzentrationen lagen im Bereich 10,36 – 82,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Der Neutralrottest konnte keine Abnahme der Zellvitalität bei beiden Zelllinien nachweisen (Abbildung 13 A, B).

Der WST-1-Test wies bei der NCI-H322-Zelllinie (Abbildung 13 C) bei steigender Probenkonzentration eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität auf. Bei der höchsten MPA-Probenkonzentration von 119,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde ein MW der mitochondrialen Aktivität von 85,88 % ermittelt. Im MPA-Konzentrationsbereich 15,00 – 60,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden MW der mitochondrialen Aktivität im Bereich 98,43 – 102,61 % erhoben (Anhang Tabelle A.10; Versuchsdatum 2014-05-07).

Der WST-1-Test zeigte bei der A549-Zelllinie (Abbildung 13 D) bei steigender Probenkonzentration eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Die A-549-Zellen hatten bei der höchsten MPA-Probenkonzentration von 116,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einen MW der mitochondrialen Aktivität von 74,02 %. Im MPA-Konzentrationsbereich 14,60 – 58,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lagen die MW der mitochondrialen Aktivität im Bereich 94,85 – 103,01 % (Anhang Tabelle A.12; Versuchsdatum 2014-05-07).

Der WST-1-Test hat bei beiden Zelllinien eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität im MPA-Konzentrationsbereich 116,90 – 119,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ergeben. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass der Ligand MPA einen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität hat. Dieser Effekt trat erst bei hohen MPA-Probenkonzentrationen auf. Diese zytotoxischen Konzentrationen wurden als solche in den Hauptversuchen nur von den CdSe/CdS-NaSt selbst eingesetzt und nicht vom reinen Liganden MPA. Daher sollte bezüglich der beobachteten Mitochondrialen Aktivität in den CdSe/CdS-NaSt-Testreihen keine Auswirkungen auf Grund einer Zytotoxizität des Liganden MPA zu erwarten sein.

3.1.4.2 Ligand MeOH

Der Ligand MeOH diente als gebundener Lösungsvermittler. MeOH ist eine organische chemische Verbindung, die dem einfachsten Alkohol entspricht. MeOH ist als Alkohol bereits leicht toxisch; seine Abbauprodukte verursachen die höhere Toxizität.

Um aufzuzeigen, ob der Ligand MeOH selbst Auswirkungen auf das Wachstum der beiden Zelllinien NCI-H322 und A-549 hat, wurden die Zellen nach ihrer Kultivierung auf Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen MeOH-Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Jede untersuchte MeOH-Lösung wurde für den WST-1-Test auf die folgenden angestrebten Probenkonzentrationen 35 $\mu\text{g/mL}$, 70 $\mu\text{g/mL}$, 140 $\mu\text{g/mL}$, 280 $\mu\text{g/mL}$ mit Stammmedium, ohne vorherige pH-Einstellung, eingestellt (vergleiche Kapitel 2.2.2.3). Der genau definierte Konzentrationsbereich wurde vor Versuchsbeginn so gewählt, dass dieser analog zu dem angestrebten Probenkonzentrationsbereich des Liganden MPA lag. In diesem Versuch entsprach die angestrebte Probenkonzentration der tatsächlichen Konzentration an MeOH.

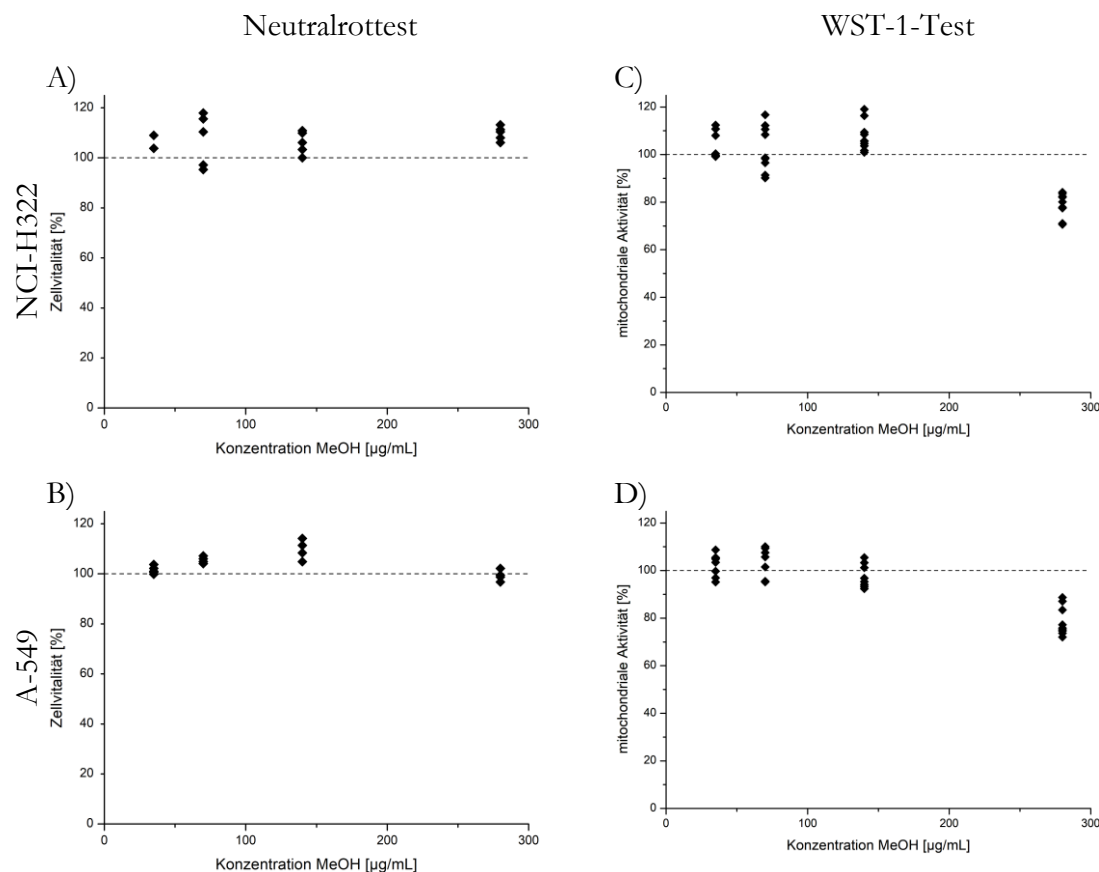


Abbildung 14: Zellvitalität [%] im Neutralrottest und mitochondriale Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur Liganden MeOH-Konzentration [µg/mL]. Die Graphen bilden die Zellvitalität [%] (A, B) und die mitochondriale Aktivität [%] (C, D) bei MeOH-Konzentrationen im Bereich 35 – 280 $\mu\text{g/mL}$ ab und resultieren aus jeweils einer unabhängigen Testreihe mit insgesamt fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen in A und B ist keine Tendenz erkennbar. Bei C und D nehmen die mitochondrialen Aktivitäten ab.

Abbildung 14 zeigt 4 Graphen, in denen die ermittelte Zellvitalität [%] (A, B) und die mitochondriale Aktivität [%] (C, D) der Zelllinien NCI-H322 (A, C) und A-549 (B, D) in

Abhängigkeit zur MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im Neutralrottest (Abbildung 14 A, B) und im WST-1-Test (Abbildung 14 C, D) dargestellt wurden.

Der Neutralrottest wies bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 14 A) eine eher gleichbleibende, konstante Zellvitalität bei steigender MeOH-Probenkonzentration auf. Die Zellvitalität lag im Bereich 95,28 – 117,94 % (Anhang Tabelle A.13, Versuchsdatum 2014-06-20).

Der Neutralrottest zeigte bei den A-549-Zellen (Abbildung 14 B) eine eher gleichbleibende, konstante Zellvitalität bei steigender MeOH-Probenkonzentration. Die Zellvitalität lag im Bereich 96,75 – 114,14 % (Anhang Tabelle A.16; Versuchsdatum 2014-06-19).

Anhand des Neutralrottests wurde in beiden Zelllinien bei den untersuchten Probenkonzentrationen kein Einfluss auf die Zellvitalität festgestellt (Abbildung 14 A, B).

Der WST-1-Test wies bei der NCI-H322-Zelllinie (Abbildung 14 C) bei steigender Probenkonzentration eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität auf. Bei der höchsten MeOH-Probenkonzentration von 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde die mitochondriale Aktivität im Bereich 70,65 – 84,15 % gemessen. Bei MeOH-Probenkonzentrationen im Bereich 35 – 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oszillierten die mitochondrialen Aktivitäten im Bereich 90,15 – 119,10 % (Anhang Tabelle A.14, Tabelle A.15; Versuchsdaten 2014-04-17 und 2014-05-07).

Der WST-1-Test zeigte bei der A-549-Zelllinie (Abbildung 14 D) bei steigender Probenkonzentration eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Bei der höchsten MeOH-Probenkonzentration von 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde die mitochondriale Aktivität im Bereich 72,06 – 102,16 % gemessen. Bei MeOH-Probenkonzentrationen im Bereich 35 – 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oszillierten die mitochondrialen Aktivitäten im Bereich 92,36 – 114,14 % (Anhang, Tabelle A.17, Tabelle A.18; Versuchsdaten 2014-04-16 und 2014-05-07).

Der WST-1-Test ließ in beiden Zelllinien eine deutliche Abnahme der mitochondrialen Aktivität bei einer MeOH-Konzentration von 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erkennen.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass der reine Ligand MeOH in der Konzentration von 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selbst einen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität ausübte. Dieser Effekt trat erst bei hohen Konzentrationen des Liganden MeOH auf. Da diese hohen, zytotoxischen Konzentrationen als solche in den Testreihen der Hauptversuche nur von den CdSe/CdS-NaSt eingesetzt wurden und nicht vom reinen Liganden MeOH, sollten keine negativen Auswirkungen bezüglich der resultierenden Zellvitalität und mitochondrialen Aktivität in den CdSe/CdS-NaSt-Testreihen auf Grund des Liganden zu erwarten sein.

3.2 Hauptversuche

Die Ergebnisse der Hauptversuche wurden weiterführend grafisch ausgewertet. Die grafische Auswertung erfolgte mittels linearer Regression oder sigmoidaler Regression. Bei einer konstanten, eher gleichbleibenden Zellvitalität oder mitochondrialen Aktivität über den Konzentrationsverlauf wurde keine weitere Auswertung vorgenommen. Die lineare Regression

wurde bei einer abnehmenden Zellvitalität oder mitochondrialen Aktivität über den gesamten Konzentrationsverlauf angewendet. Sigmoidale Regressionskurven wurden eingesetzt, wenn die MW der Zellvitalität oder mitochondrialen Aktivität Werte unter 50 % annahmen. Auf Grund der üblichen Toleranzen bei der Arbeit mit Zellkulturen weisen die Messwerte Streuungen auf. Daher wurde für diese Arbeiten mit Zellkulturen eine obere und eine untere Grenze festgelegt. Die obere Grenze (Maximum) wurde auf Werte zwischen 90 – 110 % festgelegt und die untere Grenze (Minimum) auf Werte zwischen -5 – 5 %. Zur Berechnung der Regression wurde eine fiktive Zellvitalität oder mitochondriale Aktivität von 0 % bei einer Konzentration von 100.000 µg/mL angenommen. Auf Grund vorhandener Streuungen und der Tatsache, dass bei den gewählten Probenkonzentrationen kein hundertprozentiger Zelltod feststellbar war, sind die Ergebnisse der EC₅₀-Wertberechnungen als abgeschätzte EC₅₀-Werte anzusehen, die Tendenzen zum tatsächlichen EC₅₀-Wert liefern. Die repräsentierten Daten stammen jeweils aus unabhängigen Testreihen pro Zytotoxizitätstest, deren Resultate zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst wurden.

3.2.1 CNH-A

Die Tabelle 11 präsentiert eine Übersicht der aus den unterschiedlichen Testreihen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zu dem synthetischen Nanomaterial CNH-A.

Tabelle 11: Tests mit Nanomaterial CNH-A

Zytotoxizitätstest	Neutralrot	Neutralrot	WST-1	WST-1
Zelllinie	NCI-H322	A-549	NCI-H322	A-549
unabhängige Testreihen	2	2	3	3
Verdünnungsstufen	8	8	8	8
Konzentrationsbereich [µg/mL]	5 – 1000	5 – 1000	5 – 1000	5 – 1000
MW der Zellvitalität [%] oder mitochondrialen Aktivität [%] bei höchster Probenkonzentration	82,17	77,66	41,85	39,94
Regression durchgeführt?	nein	ja, linear	ja, sigmoidal	ja, sigmoidal
EC ₅₀ -Wert [µg/mL]	-	-	995,65	671,06
Kor. R-Quadrat			0,80	0,90

3.2.1.1 Neutralrottest

Abbildung 15 stellt die MW der Zellvitalität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im Neutralrottest dar.

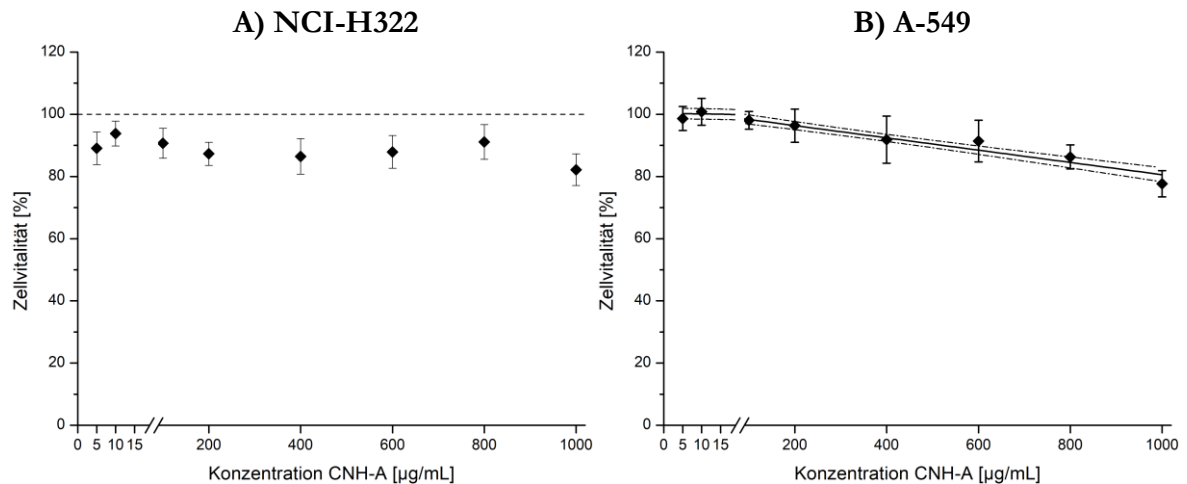


Abbildung 15: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CNH-A-Konzentration

[$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Die Graphen bilden die Zellvitalität bei CNH-A-Konzentrationen im Bereich 5 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab. Sie resultieren aus zwei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen in A ist keine Tendenz erkennbar und deshalb wurde keine Regression durchgeführt. Bei B nehmen die Zellvitalitäten ab und es wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Der Neutralrottest zeigte bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 15 A) eine eher gleichbleibende, konstante Zellvitalität bei steigender CNH-A-Probenkonzentration. Die MW der Zellvitalität oszillierten bei der Zelllinie NCI-H322 bei zunehmender CNH-A-Konzentration im Bereich 80,35 – 96,23 %. Bei den CNH-A-Konzentrationen im Bereich 5 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden Zellvitalitäten im Bereich 78,49 – 103,30 % gemessen. Bei CNH-A-Konzentrationen im Bereich 800 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden Zellvitalitäten im Bereich 74,13 – 97,80 % ermittelt (Anhang Tabelle A.19, Tabelle A.20; Versuchsdaten: 2014-02-13 und 2014-03-20). Auf weitere grafische Analysen wurde verzichtet.

Der Neutralrottest wies bei den A-549-Zellen (Abbildung 15 B) bei steigender CNH-A-Probenkonzentration eine Abnahme der Zellvitalität nach. Die Zellvitalität der Zelllinie A-549 zeigte eine sinkende Tendenz ab einer CNH-A-Konzentration von 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Der Neutralrottest wies bei der höchsten CNH-A-Probenkonzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einen MW der Zellvitalität von 77,66 % auf. Bei einer CNH-A-Konzentration im Bereich 5 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden Zellvitalitäten im Bereich 91,82 – 109,76 % gemessen. Bei CNH-A-Konzentrationen im Bereich 800 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden Zellvitalitäten im Bereich 72,05 – 90,71 % ermittelt (Anhang Tabelle A.21, Tabelle A.22; Versuchsdaten: 2014-02-12 und 2014-03-12). Eine lineare Regression wurde durchgeführt.

Die Zellvitalität der Zelllinie NCI-H322 war im Neutralrottest unverändert und nicht durch eine Exposition mit den CNH-A beeinflusst worden. Der Neutralrottest belegte hingegen bei der

A-549-Zelllinie eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität bei steigender CNH-A-Konzentration.

3.2.1.2 WST-1-Test

Abbildung 16 stellt die MW der mitochondrialen Aktivität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im WST-1-Test dar. Der WST-1-Test zeigte bei beiden Zelllinien eine Abnahme der MW der mitochondrialen Aktivität bei ansteigender CNH-A-Konzentration, wobei die Auswirkungen auf die A-549-Zelllinie stärker ausfielen. Es wurde für beide Zelllinien eine sigmoidale Regressionskurve ermittelt.

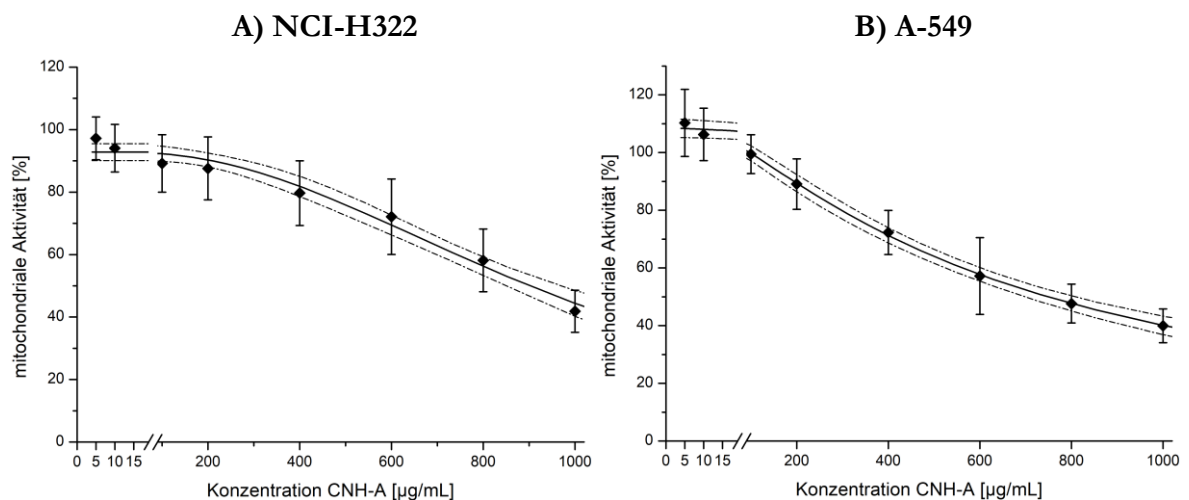


Abbildung 16: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Die Graphen bilden die mitochondrialen Aktivitäten bei CNH-A-Konzentrationen im Bereich 5 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab. Sie resultieren aus drei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen aus A und B nehmen die MW der mitochondrialen Aktivität Werte unter 50 % an. Sigmoidale Regressionskurven wurden bei den Daten von (A) und (B) durchgeführt.

Bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 16 A) zeigte der WST-1-Test eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität unter steigender CNH-A-Konzentration. Bei der höchsten eingesetzten CNH-A-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde der MW der mitochondrialen Aktivität von 41,85 % gemessen. Bei Probenkonzentration im Bereich 5 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden mitochondriale Aktivitäten im Bereich 80,20 – 104,26 % ermittelt. Bei den CNH-A-Konzentrationen im Bereich 800 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden mitochondriale Aktivitäten im Bereich 35,00 – 74,15 % gemessen (Anhang Tabelle A.23, Tabelle A.24, Tabelle A.25; Versuchsdaten: 2014-02-13, 2014-02-20 und 2014-02-27). Auf Grund der resultierenden Datenwerte wurde eine sigmoidale Regressionskurve angefertigt. Es wurde ein EC_{50} -Wert von 995,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kor. R-Quadrat 0,80) ermittelt.

Der WST-1-Test wies bei den A-549-Zellen (Abbildung 16 B) bei steigender CNH-A-Konzentration eine Abnahme in der mitochondrialen Aktivität auf. Dies wurde anhand der MW der mitochondrialen Aktivität ab der CNH-A-Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sichtbar. Bei CNH-A-Konzentrationen im Bereich 5 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden mitochondriale Aktivitäten im

Bereich 84,82 – 125,07 % gemessen. Die MW der mitochondrialen Aktivität lagen über 99,46 %. Bei den CNH-A-Konzentrationen im Bereich 800 – 1000 µg/mL wurden mitochondriale Aktivitäten im Bereich 25,46 – 58,46 % gemessen. Bei der CNH-A-Konzentration von 1000 µg/mL resultierte ein MW der mitochondrialen Aktivität von 39,94 % (Anhang Tabelle A.26, Tabelle A.27, Tabelle A.28; Versuchsdaten: 2014-02-12, 2014-02-19 und 2014-02-26). Es wurde eine sigmoidale Regressionskurve erstellt. Nach diesem Kurvenverlauf erhielt man einen EC₅₀-Wert von 671,06 µg/mL (Kor. R-Quadrat 0,90).

Insgesamt konnte anhand der Abnahme der mitochondrialen Aktivität im WST-1-Test festgestellt werden, dass beide Zelllinien stark auf die Exposition mit den CNH-A reagierten, sodass jeweils sigmoidale Regressionskurven erstellt wurden. Des Weiteren konnte anhand der resultierenden EC₅₀-Werte eruiert werden, dass die A-549-Zelllinie einen um ca. 33 % niedrigeren EC₅₀-Wert aufzeigte im Vergleich zu der NCI-H322-Zelllinie.

3.2.2 CNH-B

Die Tabelle 12 präsentiert eine Übersicht der aus den unterschiedlichen Testreihen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zu dem synthetischen Nanomaterial CNH-B.

Tabelle 12: Tests mit Nanomaterial CNH-B

	Neutralrot	Neutralrot	WST-1	WST-1
Zytotoxizitätstest	Neutralrot	Neutralrot	WST-1	WST-1
Zelllinie	NCI-H322	A-549	NCI-H322	A-549
unabhängige Testreihen	3	1	3	4
Verdünnungsstufen	8	8	7	7
Konzentrationsbereich [µg/mL]	5 – 1000	5 – 1000	10 – 1000	10 – 1000
MW der Zellvitalität [%] oder mitochondrialen Aktivität [%] bei höchster Probenkonzentration	89,25	72,70	41,10	31,04
Regression durchgeführt?	nein	ja, linear	ja, sigmoidal	ja, sigmoidal
EC₅₀-Wert [µg/mL]	-	-	932,50	501,65
Kor. R-Quadrat			0,72	0,8

3.2.2.1 Neutralrottest

Abbildung 17 stellt die MW der Zellvitalität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im Neutralrottest dar.

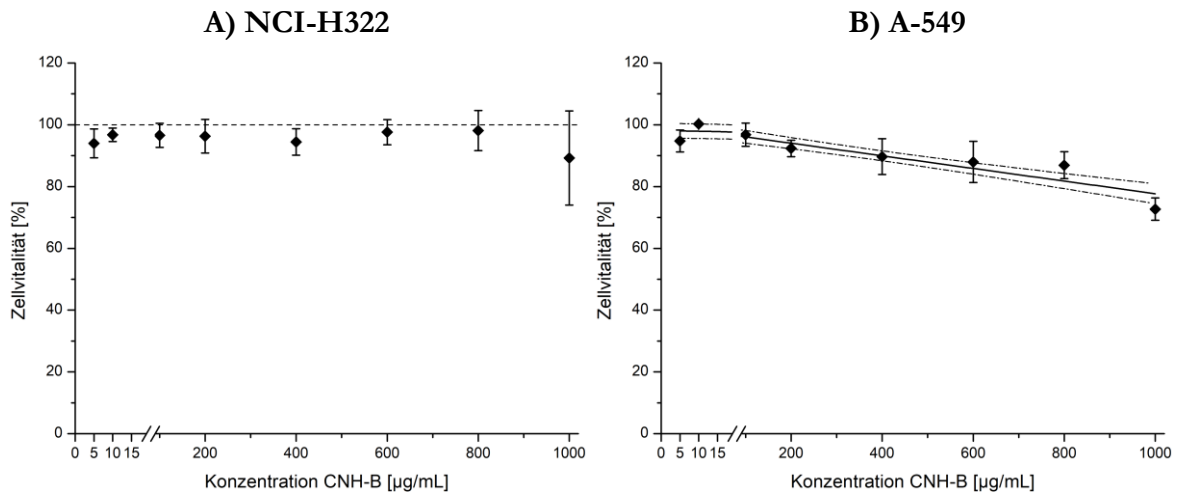


Abbildung 17: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CNH-B-Konzentration

[$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Die Graphen bilden Zellvitalitäten bei CNH-B-Konzentrationen im Bereich 5 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab. Sie resultieren aus drei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen in A ist keine Tendenz erkennbar und deshalb wurde keine Regression durchgeführt. Bei B nehmen die Zellvitalitäten ab und es wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Der Neutralrottest zeigte bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 17 A) eine eher gleichbleibende, konstante Zellvitalität bei steigender CNH-B-Probenkonzentration. Die MW der Zellvitalität der Zelllinie NCI-H322 zeigten im Neutralrottest bis zu der CNH-B-Konzentration von 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eher gleichbleibende, konstante MW, wobei die Zellvitalitäten im Bereich 85,48 – 106,82 % oszillierten. Bei der CNH-B-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde die Zellvitalität im Bereich 57,05 – 104,48 % gemessen. Die Standardabweichungen wiesen ab der CNH-B-Konzentration von 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hohe Werte auf. Bei der CNH-B-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lag der MW der Zellvitalität bei 89,25 % \pm 15,24 %. Auf Grund der Standardabweichung wurden keine weiteren grafischen Analysen erstellt (Anhang Tabelle A.29, Tabelle A.30, Tabelle A.31; Versuchsdaten: 2014-03-13, 2014-03-20 und 2014-04-03).

Der Neutralrottest wies bei der A-549-Zelllinie (Abbildung 17 B) bei steigender CNH-B-Probenkonzentration eine Abnahme der Zellvitalität auf. Die MW der Zellvitalität der Zelllinie A-549 hatten im Neutralrottest bei einer CNH-B-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einen MW der Zellvitalität von 72,70 %. Hier wurde die Zellvitalität im Bereich 69,55 – 78,84 % ermittelt. Bei einer CNH-B-Probenkonzentrationen im Bereich 5 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oszillierten die Zellvitalitäten der A-549-Zellen im Bereich 88,93 – 101,05 %. Ab einer CNH-B-Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde eine sinkende Tendenz der Zellvitalität erkennbar und der MW der Zellvitalität sank sukzessiv ab. Bei einer CNH-B-Konzentration im Bereich 800 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden Zellvitalitäten im Bereich 69,55 – 93,38 % gemessen. Ein linearer Kurvenverlauf stellt die Daten dar (Anhang Tabelle A.32; Versuchsdatum: 2014-03-26).

Bei der Zelllinie NCI-H322 wurde durch den Neutralrottest kein Einfluss auf die Zellvitalität nach erfolgter Exposition mit den CNH-B nachgewiesen. Der Neutralrottest belegte bei der A-549-Zelllinie eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität bei steigender CNH-B-Konzentration.

3.2.2.2 WST-1-Test

Abbildung 18 stellt die MW der mitochondrialen Aktivität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im WST-1-Test dar. Der WST-1-Test zeigte bei beiden Zelllinien eine Abnahme der MW der mitochondrialen Aktivität bei ansteigender CNH-B-Konzentration, wobei die Auswirkungen auf die A-549-Zelllinie stärker ausfielen. Es wurde für beide Zelllinien eine sigmoidale Regressionskurve ermittelt.

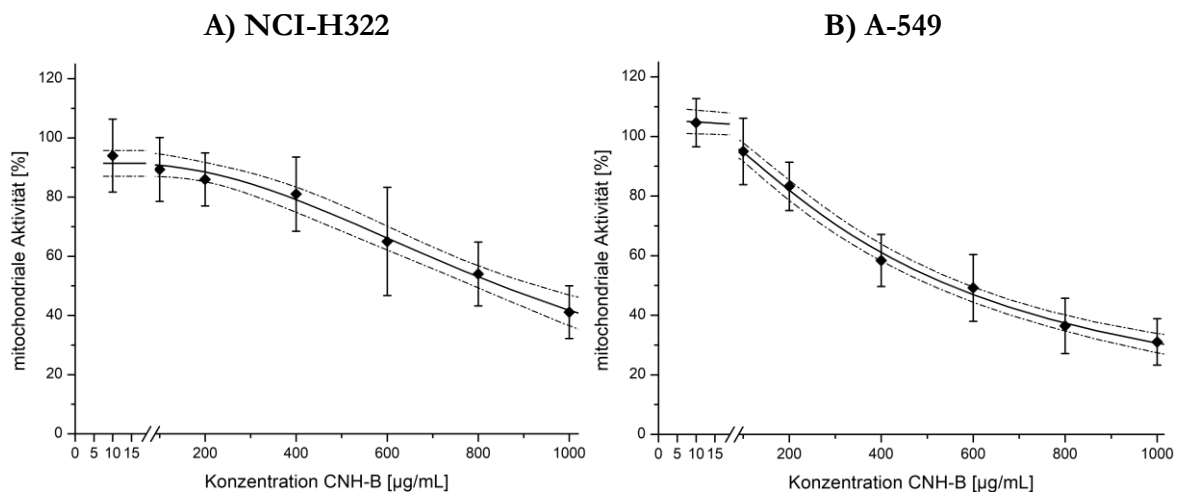


Abbildung 18: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$].

Die Graphen bilden die mitochondrialen Aktivitäten bei CNH-B-Konzentrationen im Bereich 10 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab. Sie resultieren aus drei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen aus A und B nehmen die MW der mitochondrialen Aktivität Werte unter 50 % an. Sigmoidale Regressionskurven wurden bei den Daten von (A) und (B) durchgeführt.

Bei den NCI-H322-Zellen zeigte der WST-1-Test (Abbildung 18 A) eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität unter steigender CNH-B-Konzentration. Die MW der mitochondrialen Aktivität der Zelllinie NCI-H322 wiesen im WST-1-Test eine Abnahme bis auf 41,10 % bei der CNH-B-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf. Hier lag die mitochondriale Aktivität im Bereich 27,83 – 51,09 %. Die mitochondriale Aktivität der Zelllinie NCI-H322 nahm ab einer CNH-B-Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kontinuierlich ab. Die Standardabweichung der einzelnen Replikate war erhöht (Anhang Tabelle A.33, Tabelle A.34, Tabelle A.35; Versuchsdaten: 2013-10-09, 2013-11-21 und 2013-12-05). Es wurde eine sigmoidale Regressionskurve ermittelt. Nach diesem Kurvenverlauf erhielt man einen EC_{50} -Wert von 932,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kor. R-Quadrat 0,72).

Beim WST-1-Test der Zelllinie A-549 (Abbildung 18 B) nahm die mitochondriale Aktivität mit steigender CNH-B-Konzentration ab. Die MW der mitochondrialen Aktivität der Zelllinie A-549 wiesen eine Abnahme bis auf 31,04 % bei einer CNH-B-Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

im WST-1-Test auf. Die mitochondriale Aktivität lag hier im Bereich 21,13 – 45,52 %. Die Zelllinie A-549 reagierte ab der CNH-B-Konzentration von 200 µg/mL mit einer Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Bei einer CNH-B-Konzentration von 10 µg/mL wurde die mitochondriale Aktivität im Bereich 91,56 – 121,87 % gemessen (Anhang Tabelle A.36, Tabelle A.37, Tabelle A.38; Versuchsdaten: 2013-10-09, 2013-11-20 und 2014-02-05). Auf Grund der resultierenden Datenwerte wurde eine sigmoide Regressionskurve erstellt. Nach diesem Kurvenverlauf erhielt man einen EC₅₀-Wert von 496,48 µg/mL (Kor. R-Quadrat 0,8).

Insgesamt konnte im WST-1-Test festgestellt werden, dass bei beiden Zelllinien die mitochondriale Aktivität nach einer Exposition mit CNH-B stark abnahm, sodass jeweils sigmoide Regressionskurven erstellt wurden. Des Weiteren konnte anhand der resultierenden EC₅₀-Werte eruiert werden, dass die A-549-Zelllinie einen um ca. 53 % niedrigeren EC₅₀-Wert aufzeigte im Vergleich zu der NCI-H322-Zelllinie.

3.2.3 CdSe/CdS-NaSt

Die Tabelle 13 präsentiert eine Übersicht der aus den unterschiedlichen Testreihen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zu dem synthetischen Nanomaterial CdSe/CdS-NaSt.

Tabelle 13: Tests mit Nanomaterial CdSe/CdS-NaSt

Zytotoxizitätstest	Neutralrot	Neutralrot	WST-1	WST-1
Zelllinie	NCI-H322	A-549	NCI-H322	A-549
unabhängige Testreihen	2	2	3	3
Verdünnungsstufen	7	7	8	8
Konzentrationsbereich [µg/mL]	0,09 – 481,5	0,91 – 681,0	9,3 – 648,5	9,0 – 495,37
MW der Zellvitalität [%] oder mitochondrialen Aktivität [%] bei höchster Probenkonzentration	98,92	59,60	53,54	48,20
Regression durchgeführt?	nein	ja, linear	ja, linear	ja, sigmoidal
EC ₅₀ -Wert [µg/mL]	-	-	-	341,33
Kor. R-Quadrat				0,82

3.2.3.1 Neutralrottest

Abbildung 19 stellt die MW der Zellvitalität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im Neutralrottest dar. Die Probenkonzentrationen wurden in tatsächlichen CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen angegeben.

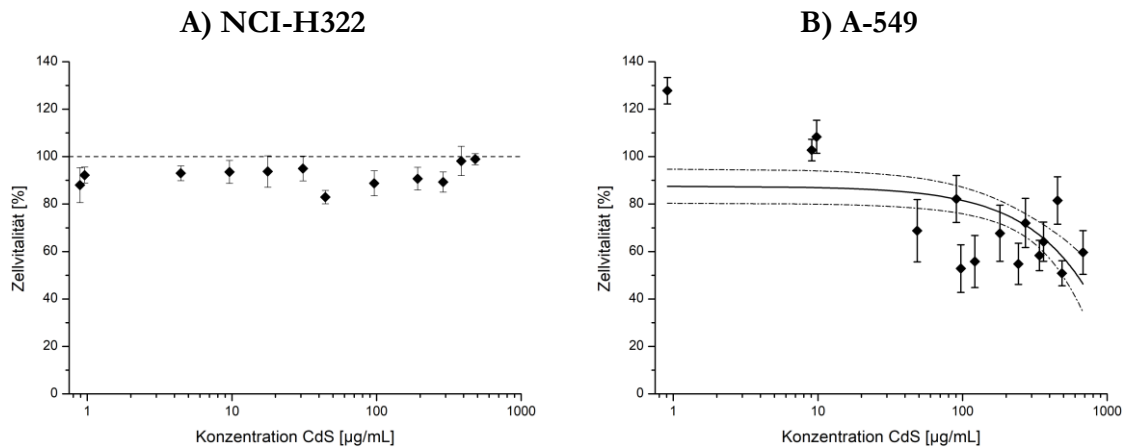


Abbildung 19: MW der Zellvitalität [%] im Neutralrottest in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt-

Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Die Graphen bilden die Zellvitalitäten bei CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen im Bereich 0,09 – 481,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei der Zelllinie NCI-H322 beziehungsweise im Bereich 0,91 – 681,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei der Zelllinie A-549 ab. Sie resultieren aus zwei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei den Ergebnissen in A ist keine Tendenz erkennbar und deshalb wurde keine Regression durchgeführt. Bei B nehmen die Zellvitalitäten ab und es wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Bei den NCI-H322-Zellen (Abbildung 19 A) oszillierte die Zellvitalität über alle Probekonzentrationen der CdSe/CdS-NaSt. Es wurde kein Einfluss auf die Zellvitalität erkennbar. Die MW der Zellvitalität der Zelllinie NCI-H322 zeigten im Neutralrottest keine Abnahme bei zunehmender CdSe/CdS-NaSt-Konzentration auf. Bei den CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen 0,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 44,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden die niedrigsten MW der Zellvitalität mit 83,25 % und 82,92 % erlangt. Bei der höchsten CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 481,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lag der MW der Zellvitalität bei 98,92 %. Hier resultierte die Zellvitalität im Bereich 96,54 – 101,40 % (Anhang Tabelle A.39, Tabelle A.40; Versuchsdaten: 2013-09-12 und 2013-11-28). Es gab keine weitere Ermittlung von grafischen Analysen.

Der Neutralrottest wies bei den A-549-Zellen (Abbildung 19 B) eine Abnahme der Zellvitalität bei steigender CdSe/CdS-NaSt-Probenkonzentration auf. Die A-549-Zellen hatten bei CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen im Bereich 0,91 – 9,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zellvitalitäten im Bereich 98,71 – 133,28 %. Hier lagen die MW der Zellvitalitäten über 102,73 %. Ab der CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 48,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nahm die Zellvitalität ab. Bei der höchsten CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 681,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lag die Zellvitalität im Bereich 49,44 – 70,62 % vor und der MW der Zellvitalität bei 59,60 %. Im CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationsbereich 48,6 – 681,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ schienen die Zellvitalitäten auf einem deutlich reduzierten Niveau zu oszillieren. Hier lag die Zellvitalität im Bereich 41,67 – 93,98 %. Die Zellvitalitätswerte wiesen stärkere Streuungen auf (Anhang Tabelle A.41, Tabelle A.42;

Versuchsdaten: 2013-11-27 und 2014-01-08). Auf Grund der resultierenden Datenwerte wurde eine lineare Regressionskurve angefertigt.

Bei der Zelllinie NCI-H322 konnte mittels Neutralrottest kein Einfluss auf die Zellvitalität durch eine Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt nachgewiesen werden. Der Neutralrottest zeigt allein bei der A-549-Zelllinie eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität bei steigender CdSe/CdS-NaSt-Konzentration.

3.2.3.2 WST-1-Test

Abbildung 20 stellt die MW der mitochondrialen Aktivität mit dazugehöriger Standardabweichung [%] der Zelllinien NCI-H322 (A) und A-549 (B) in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] im WST-1-Test dar. Der WST-1-Test zeigte bei beiden Zelllinien eine Abnahme der MW der mitochondrialen Aktivität bei ansteigender CdSe/CdS-NaSt-Konzentration, wobei die Auswirkungen auf die A-549-Zelllinie stärker ausfielen. Es wurde für die A-549-Zelllinie eine sigmoidale Regressionskurve ermittelt. Die Probenkonzentrationen wurden in tatsächlichen CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen angegeben.

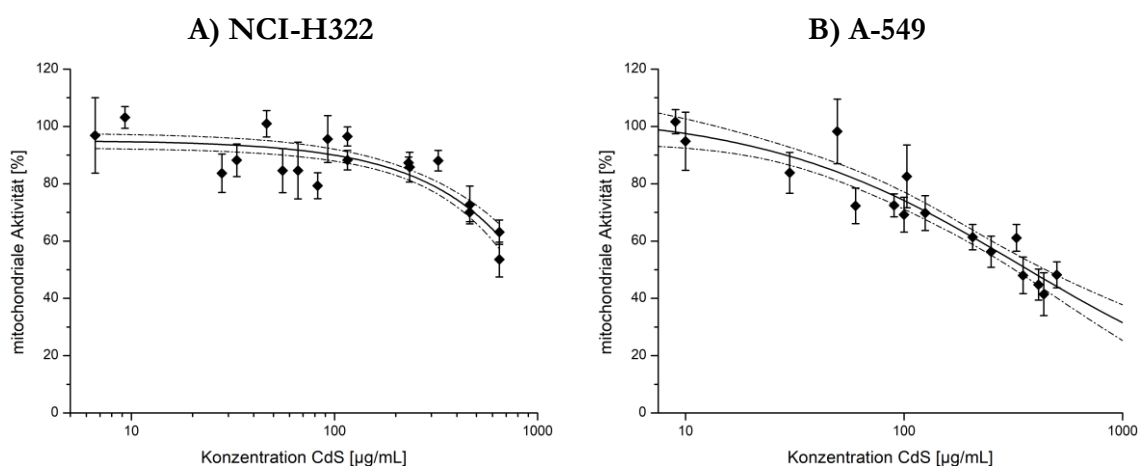


Abbildung 20: MW der mitochondrialen Aktivität [%] im WST-1-Test in Abhängigkeit zur CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Die Graphen bilden mitochondriale Aktivitäten bei

CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen im Bereich 9,3 – 648,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei der NCI-H322-Zelllinie und im Bereich 9 – 495,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei der A-549-Zelllinie ab. Sie resultieren aus drei unabhängigen Testreihen mit jeweils fünf Replikaten pro Probenkonzentration. Bei A nehmen die mitochondrialen Aktivitäten ab und es wurde eine lineare Regression durchgeführt. Bei den Ergebnissen aus B nehmen die MW der mitochondrialen Aktivität Werte unter 50 % an. Eine Sigmoidale Regressionskurve wurde bei den Daten (B) durchgeführt.

Bei den NCI-H322-Zellen zeigte der WST-1-Test (Abbildung 20 A) eine sinkende Tendenz der MW der mitochondrialen Aktivität mit steigender CdSe/CdS-NaSt-Konzentration. Die sinkende Tendenz der mitochondrialen Aktivität wurde ab den Konzentrationen 462,9 – 463,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erkennbar. Hier lagen die MW der mitochondrialen Aktivität im Bereich 70,00 – 72,61 %. Bei den CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen im Bereich 9,32 – 31,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streuten die einzelnen mitochondrialen Aktivitäten. Im Bereich der maximalen CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen 648,0 – 648,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hatte die Zelllinie NCI-H322 im WST-1-Test MW der mitochondrialen Aktivität im Bereich 53,54 – 63,11 % (Anhang Tabelle

A.43, Tabelle A.44, Tabelle A.45; Versuchsdaten: 2013-11-21, 2013-12-05 und 2014-01-09). Auf Grund der resultierenden Datenwerte wurde eine lineare Regressionskurve angefertigt.

Beim WST-1-Test der Zelllinie A-549 (Abbildung 20 B) nahm die mitochondriale Aktivität ab der CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 29,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab. Bei einer CdSe/CdS-NaSt-Konzentration im Bereich 90,3 – 103,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultierten die mitochondrialen Aktivitäten im Bereich 64,17 – 95,64 %. Hier lagen die MW der mitochondrialen Aktivität im Bereich 69,18 – 82,57 %. Bei den höchsten untersuchten CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen im Bereich 412,0 – 495,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden mitochondriale Aktivitäten im Bereich 31,85 – 53,34 % gemessen. Die resultierenden MW der mitochondrialen Aktivität lagen im Bereich von 41,45 – 48,20 % (Anhang Tabelle A.46, Tabelle A.47, Tabelle A.48; Versuchsdaten: 2013-10-09, 2013-11-20 und 2013-12-04). Auf Grund der resultierenden Datenwerte wurde eine sigmoidale Regressionskurve erstellt. Nach diesem Kurvenverlauf erhielt man einen EC_{50} -Wert von 341,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei einem Kor. R-Quadrat 0,82.

Insgesamt konnte im WST-1-Test festgestellt werden, dass bei beiden Zelllinien die mitochondriale Aktivität nach einer Exposition mit CdSe/CdS-NaSt stark abnahm. Die A-549-Zelllinie wies im Vergleich mit den NCI-H322-Zellen MW der mitochondrialen Aktivität unter 50 % auf, sodass eine sigmoidale Regressionskurve erstellt wurde.

4 Diskussion

Die menschlichen Lungentumorzelllinien NCI-H322 und A-549 dienen als non-invasives Testsystem, um erste Erkenntnisse über die Wirkung der synthetischen Nanomaterialien auf die peripheren Luftwege zu erhalten. Die Zellen der Zelllinie NCI-H322 sind Bronchialepithelzellen und die der A-549 Zelllinie Alveolarepithelzellen. Die Zelllinien wachsen als Monozellschicht im Zellverband und dienen in der Forschung bereits als integriertes Testsystem in Zytotoxizitätstests von Chemikalien. Mögliche Auswirkungen auf die Zellen wurden anhand des Neutralrottests, der die Zellvitalität über eine Unversehrtheit von Membranen (lysosomale Membran und Zellmembran) untersucht und des WST-1-Tests, der die mitochondriale Aktivität über eine enzymatisch-intakte Atmungskette prüft, begutachtet. Obwohl *In-vitro*-Untersuchungen nur annäherungsweise die *In-vivo*-Situation eines komplexen lebenden Organismus wie den Menschen widerspiegeln können, liefern sie Informationen, die für ein besseres Verständnis zur Wirkweise von Stoffen beitragen können. Hierbei sollte geschaut werden, ob die Partikelgröße der synthetischen Nanomaterialien CNH und CdSe/CdS-NaSt Einfluss auf die Zytotoxizität ausübt und ob die beiden Zelllinien in ihrer Sensitivität gegenüber der synthetischen Nanomaterialien Unterschiede aufweisen. Eine Hemmung in der Zellvitalität und/oder der mitochondrialen Aktivität würden somit erste Hinweise hinsichtlich einer zytotoxischen Wirkung liefern. Auf Grund vorhandener Streuungen und der Tatsache, dass bei den gewählten Probenkonzentrationen kein hundertprozentiger Zelltod feststellbar war, sind die Ergebnisse der EC_{50} -Wertberechnungen als abgeschätzte EC_{50} -Werte anzusehen, die Tendenzen zu den tatsächlichen EC_{50} -Werten liefern.

4.1 Toxizität der CNH

In dieser Arbeit wurden die einwandigen CNH-Fraktionen CNH-A mit primärer Partikelgröße 60 – 80 nm und CNH-B mit primärer Partikelgröße 60 – 200 nm untersucht. In den *In-vitro*-Untersuchungen wurde der Einfluss der CNH-Fraktionen mit Konzentrationen im Bereich 5 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf die Bronchial- und die Alveolarepithelzellen betrachtet.

Bronchialepithelzellen reagieren auf die Exposition mit den beiden CNH-Fraktionen mit Hemmungen der Zellvitalität im untersuchten Bereich bis zu einer maximalen Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die ermittelten schwachen Hemmungen durch die CNH-Fraktionen betragen 11 % bei den CNH-B und 18 % bei den CNH-A. Die Hemmungen sind ähnlich schwach in ihrer Ausprägung, wobei die Standardabweichung bei CNH-B eine zusätzliche Validierung der Ergebnisse nahelegt. In diesem Testverfahren zur Zellvitalität sind Bronchialepithelzellen ähnlich robust gegenüber den beiden CNH-Fraktionen.

Die CNH-Fraktionen verursachen konzentrationsabhängige Hemmungen der mitochondrialen Aktivität in den Bronchialepithelzellen, die sich in ihrer Ausprägung kaum unterscheiden. Ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemmen die beiden CNH-Fraktionen

konzentrationsabhängig die mitochondriale Aktivität in den Bronchialepithelzellen. Bei der maximalen Konzentration von 1000 µg/mL bewirken die CNH-A-Fraktion eine Hemmung von 58,2 % und die CNH-B-Fraktion eine Hemmung von 58,9 % in der mitochondrialen Aktivität der Bronchialepithelzellen. Ein Vergleich der über die mitochondriale Aktivität in Bronchialepithelzellen ermittelten effektiven Konzentrationen, welche eine 50%ige Hemmung bewirken, zeigt eine ähnliche Hemmung beider Fraktionen: $EC_{50}(\text{CNH-A}) = 995,65 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 932,50 \mu\text{g/mL}$. Der WST-1-Test zeigt durch die ermittelten Hemmungen in der mitochondrialen Aktivität der Bronchialepithelzellen, dass diese ähnlich robust gegenüber einer Exposition mit den verschiedenen CNH-Fraktionen sind.

Alveolarepithelzellen reagieren auf eine Exposition mit den synthetischen Nanomaterialien mit Hemmungen der Zellvitalität. Hierbei bewirken die beiden CNH-Fraktionen bei der maximalen untersuchten Konzentration von 1000 µg/mL schwache Hemmungen bei CNH-A von 22 % und bei CNH-B von 27 %. Beide CNH-Fraktionen bewirken eine Hemmung der Zellvitalität ab einer Konzentration von 200 µg/mL. Alveolarepithelzellen sind hinsichtlich ihrer Zellvitalität ähnlich robust gegenüber den verschiedenen CNH-Fraktionen.

Die mitochondriale Aktivität der Alveolarepithelzellen wird konzentrationsabhängig ab 200 µg/mL von beiden CNH-Fraktionen gehemmt. Bei einer Konzentration von 1000 µg/mL wird die mitochondriale Aktivität von Alveolarepithelzellen durch die CNH-A-Fraktion um 60,1 % und durch die CNH-B-Fraktion um 69,0 % gehemmt. In der mitochondrialen Aktivität von Alveolarepithelzellen veranschaulicht der Vergleich der ermittelten effektiven Konzentrationen, welche eine 50%ige Hemmung bewirken, die stärkere Hemmung durch die CNH-B-Fraktion im Vergleich zur CNH-A-Fraktion: $EC_{50}(\text{CNH-A}) = 671,06 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 501,65 \mu\text{g/mL}$. Somit sind Alveolarepithelzellen hinsichtlich der CNH-A-Fraktion mit schmalere Größenspektrum robuster als gegenüber der CNH-B-Fraktion.

Diese Arbeit hat mit dem Neutralrottest die Zellvitalität über die Intaktheit von Lysosomen und der Zellmembran untersucht. Nanohörner unterhalten bioadhärente Wechselwirkungen mit Membranen (Shi et al. 2017) und verändern dadurch die Membranstruktur (Dawson et al. 2009; Shi et al. 2009; Yang M et al. 2014; Devereux et al. 2018). Bereits Cao et al. (2015) und Devereux et al. (2018) konnten modifizierte einwandige CNH intrazellulär in Lysosomen nachweisen. *In vitro* zeigen Lysosomen von Makrophagen, als sauren Speicherort innerhalb der Zelle, einen Zerfall des Kohlenstoffgerüsts der Hornstrukturen (Zhang et al. 2015) und die lysosomalen Membranen werden destabilisiert und durchlässig (Schober et al. 2012; Tahara et al. 2012; Yang M et al. 2014; Shi et al. 2017; He et al. 2018), sodass es zur Mitochondrienschädigung über die Freisetzung von lysosomalen Enzymen kommt und dies der zugrundeliegende Toxizitätsmechanismus der CNH ist (Yang M et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte eine zelllinienabhängige Beeinträchtigung der menschlichen Lungentumorzelllinien nach

Exposition mit den einwandigen CNH-Fraktionen durch eine schwache Hemmung der Zellvitalität nachgewiesen werden. Eine mögliche Freisetzung von lysosomalen Enzymen wurde nicht untersucht und kann nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde mit dem WST-1-Test in dieser Arbeit die Unversehrtheit der mitochondrialen Atmungskette untersucht, wodurch eine mäßige Hemmung belegt wurde. Hierbei zeigte die Hemmung der mitochondrialen Aktivität bei maximaler Konzentration von 1000 µg/mL Unterschiede in der Intensität durch beide CNH-Fraktionen und Zelllinien. Dabei ist hervorzuheben, dass über die mitochondriale Aktivität in beiden Zelllinien in Folge der Exposition mit den CNH-Fraktionen eine 50%ige Hemmung ermittelt werden konnte. Auch Schramm et al. (2016) belegen, dass die Zytotoxizität der CNH-Fraktionen durch metabolische Tests empfindlicher nachgewiesen wird als über die Integrität der Membran. Ebenso bestätigen Li et al. (2018) und Cao et al. (2015) eine starke zytotoxische Wirkung der einwandigen CNH auf mitochondrialer Ebene unterschiedlicher menschlicher Tumorzelllinien und bekräftigen somit die Ergebnisse dieser Arbeit. Ferner ist in weiteren Studien zu untersuchen, inwiefern neben der Beeinträchtigung der Zellvitalität und der mitochondrialen Aktivität eine Auswirkung durch CNH auf die Zellviabilität vorhanden ist.

CNH wurden bislang niedrig toxisch eingestuft (Zhang et al. 2015; Devereux et al. 2018). Die in dieser Arbeit untersuchten CNH-Fraktionen zeichnen sich laut Hersteller durch ihre hohe Reinheit aus und dispergieren im wässrigen Medium ohne Funktionalisierung ihrer dreidimensionalen Struktur. Laut Schramm et al. (2015) kann trotz Ultraschall und Vortexen ein Agglomerieren der beiden CNH-Fraktionen nicht verhindert werden. Zusätzlich konnte die im Gewebe angenommene stabile und inerte Einstufung von kohlenstoffhaltigem Nanomaterial aufgrund ihrer Grafitstruktur widerlegt und eine Zersetzung von CNH im biologischen Milieu nachgewiesen werden (Zhang et al. 2015; Devereux et al. 2018).

4.2 Toxizität von CdSe/CdS-NaSt

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der zytotoxische Einfluss von CdSe/CdS-NaSt und deren hydrophiler Liganden MPA und MeOH auf die Zellvitalität und die mitochondriale Aktivität von Bronchial- und Alveolarepithelzellen untersucht. In den *In-vitro*-Untersuchungen wurden die CdSe/CdS-NaSt mit Konzentrationen im Bereich 0,09 – 648,5 µg/mL verwendet.

Bronchialepithelzellen zeigen in den durchgeführten Untersuchungen oszillierende Zellvitalitäten im untersuchten Konzentrationsbereich 0,09 - 481,5 µg/mL. Bei der CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 481,5 µg/mL wurde der MW der Zellvitalität von 98,92 % ± 2,34 ermittelt. Es wird keine durch CdSe/CdS-NaSt bedingte Hemmung der Zellvitalität abgeleitet.

Die CdSe/CdS-NaSt hemmen ab 27,88 µg/mL konzentrationsabhängig die mitochondriale Aktivität in den Bronchialepithelzellen. Im Bereich der CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen 115,86 - 324,0 µg/mL liegt eine schwache Hemmung bis zu 15 % in den unabhängigen Testreihen vor. Bei Konzentrationen der CdSe/CdS-NaSt, die 324,0 µg/mL übersteigen, nimmt die Hemmung zu. Die Daten zeigen bei maximaler CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 648,5 µg/mL eine mäßige Hemmung von 46 %. Über die mitochondriale Aktivität in Bronchialepithelzellen konnte in Folge der Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt keine 50%ige Hemmung bei der maximalen Konzentration von 648,5 µg/mL ermittelt werden.

Alveolarepithelzellen weisen bei Konzentrationen im Bereich 48,6 – 90,7 µg/mL eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellvitalität von 17,8 – 31,2 % auf. Die Zellvitalität der Alveolarepithelzellen zeigt bei der Konzentration von 486,5 µg/mL eine mäßige Hemmung von 49 %. Bei der höchsten Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 681,0 µg/mL liegt eine Hemmung von 40 % vor.

Die CdSe/CdS-NaSt hemmen ab einer Konzentration von 29,72 µg/mL konzentrationsabhängig die mitochondriale Aktivität in den Alveolarepithelzellen. Im Bereich der CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen 59,45 – 123,85 µg/mL liegt eine schwache bis mäßige Hemmung bis zu 31 % der mitochondrialen Aktivität in den Alveolarepithelzellen vor. Bei CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen, die größer als 123,85 µg/mL sind, nimmt die Hemmung der mitochondrialen Aktivität insgesamt zu. Bei einer Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 495,37 µg/mL liegt eine starke Hemmung der mitochondrialen Aktivität von 52 % vor. Eine um 50 % reduzierte mitochondriale Aktivität wird von den CdSe/CdS-NaSt in den Alveolarepithelzellen bei einer effektiven Konzentration von 341,33 µg/mL hervorgerufen.

Obwohl die Zellvitalität nach der Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt bei Bronchialepithelzellen keine Hemmung zeigt und unbeeinträchtigt erscheint, weist die mitochondriale Aktivität eine starke Hemmung dieser Zelllinie auf. Früh plädierten Santone et al. (1982) einen sensibleren Nachweis der Zytotoxizität des Cadmiums durch metabolische Zelltestverfahren zu erhalten.

Weiterhin ist die Stabilität der synthetischen Nanopartikel CdSe/CdS-NaSt im biologischen Milieu zu diskutieren. Heterogene Gebilde wie CdSe/CdS-NaSt als QD mit Ummantelung gelten nach Yang P et al. (2014) als stabil. Yangs rein physikalisch-chemische Arbeit ist nicht mit den Versuchsbedingungen dieser Arbeit, wie z. B. der Expositionszeit, dem biologischen Milieu und WST-1-Testverfahren, vergleichbar. Vergleichbare Versuchsbedingungen wurden in der Arbeitsgruppe von Nagy et al. (2013) angewendet. Hierbei wurde festgestellt, dass CdSe-QDs mit funktionellen Oberflächengruppen kurz nach Zugabe des Zellmediums zu Zusammenballungen von über 1 µm Durchmesser agglomerieren. Die CdSe/CdS-NaSt meiner Arbeit sind laut Hersteller nur unter optimalen Milieubedingungen (Lagerbedingungen) stabil. Um Zusammenballungen in den Testreihen dieser Arbeit vorzubeugen, erfolgte die pH-Wert-

Einstellung der Stammlösung direkt vor Versuchsbeginn und die jeweilige Verdünnungsstufe der Verdünnungsreihe wurde als die Zellen medienfrei vorlagen direkt fertiggestellt. Vorversuche dieser Arbeit zeigten, dass das Absenken des pH-Wertes in für die Testverfahren notwendige pH-Bereiche einen nicht auszuschließenden Einfluss auf die Zellvitalität und die mitochondriale Aktivität ausüben kann. Zum Ausschluss dieses Einflusses wurden Referenznegativkontrollen NK-pH und NK in den Hauptversuchen mitgeführt, sodass die ermittelten Zytotoxizitäten auf den CdSe/CdS-NaSt beruhen. Eine inerte Eigenschaft von CdSe/CdS-NaSt ist bei einem neutralen bis schwach basischen pH-Wert des biologischen Milieus nicht gegeben. Damit unterstützen meine Ergebnisse Forschungen, die belegen, dass Zellen durch CdSe/CdS-NaSt im Besonderen in der mitochondrialen Aktivität zytotoxisch gehemmt werden.

Bereits Rikans und Yamano (2000) postulieren in ihrer Arbeit, dass die Schädigung der Mitochondrien die Grundlage der initialen Toxizität des Cadmiums bilde. Bedingt durch Cadmiumionen, die an Mitochondrien binden und zu einer mitochondrialen Dysfunktion und Schädigung führen. Konsens besteht über die Freisetzung von Cadmiumionen aus cadmiumhaltigen Nanopartikeln (Derfus et al. 2004; Kirchner et al. 2005; Zhang T et al. 2006; Li et al. 2009; Soenen et al. 2015). Cadmiumionen wirken, gleichermaßen wie der Feststoff CdS oder CdSe, konzentrationsabhängig zytotoxisch (Santone et al. 1982; Derfus et al. 2004; Zhang Y et al. 2006; Peng et al. 2013; Roberts et al. 2013).

Weitere Arbeitsgruppen haben festgestellt, dass Stabilisierungsversuche durch Ummantelung mit Schalen oder Beschichtungen mit Liganden von cadmiumhaltigen QD einer entstandenen Zytotoxizität nur eingeschränkt entgegen wirken (Derfus et al. 2004; Kirchner et al. 2005; Zhang T et al. 2006; Roberts et al. 2013; Soenen et al. 2015; Allocca et al. 2019). Der Ligand MPA erwies sich als nicht stabil und bot keinen Schutz vor einer Freisetzung von Cadmiumionen (Kirchner et al. 2005).

Unabhängige Testreihen in Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigten, dass die reinen Liganden eine hemmende Wirkung auf die mitochondriale Aktivität ausüben können. Die Hemmung in der mitochondrialen Aktivität der Zelllinien wurde durch den Liganden MPA ab Konzentrationen von 120 µg/mL hervorgerufen und durch den Liganden MeOH ab deutlich höheren Konzentrationen von 280 µg/mL. Des Weiteren ist ein Abspalten der Liganden vom Nanostäbchen in den Hauptversuchen nicht auszuschließen und somit ist ein additiver zytotoxischer Effekt denkbar. Die Zytotoxizität von cadmiumhaltigen Nanopartikel wird durch eine Kombination unterschiedlicher Faktoren wie Liganden, Ummantelungen, UV-Licht, Aggregation, Aufnahmeroute der Partikel, Zelllinie und Zellmedium bedingt (Derfus et al. 2004; Kirchner et al. 2005) und ist nicht allein auf die Freisetzung von Cadmiumionen zurückzuführen (Nagy et al. 2012; Soenen et al. 2015).

4.3 Toxizitätsvergleich der Nanomaterialien hinsichtlich ihrer Größe

In dieser Arbeit wurden die einwandigen CNH-Fractionen CNH-A mit primärer Partikelgröße 60 – 80 nm und CNH-B mit primärer Partikelgröße 60 – 200 nm, sowie die CdSe/CdS-NaSt mit einem Durchmesser von 4 – 8 nm und einer Länge von 30 – 60 nm untersucht. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Größenfraktionen der CNH erzeugt die CNH-B-Fraktion mit breiterem Größenspektrum eine stärkere Hemmung, die über die Zellvitalität in den Alveolarepithelzellen und über die mitochondriale Aktivität in beiden Zelllinien nachgewiesen wird. Die Ergebnisse zur Zellvitalität der Bronchialepithelzellen bleiben unberücksichtigt (siehe 4.1). Die CdSe/CdS-NaSt, als kleinstes in dieser Arbeit untersuchtes synthetisches Nanomaterial, zeigen bei den Bronchialepithelzellen im Vergleich zu den CNH keine Hemmungen in der Zellvitalität, wobei die maximale Konzentration der CdSe/CdS-NaSt mit 481,5 µg/mL unter 50 % der maximalen Konzentration der CNH-Fractionen liegt. Betrachtet man die Alveolarepithelzellen führen die CdSe/CdS-NaSt zur nachweislich stärksten Hemmung in der Zellvitalität mit 40 % bei 2/3 der maximalen Konzentration der CNH-Fractionen. Wobei die Intensität dieser Hemmung fast doppelt so stark als in der CNH-A-Fraktion ist und 1/4 stärker als in der CNH-B-Fraktion ausfällt.

Des Weiteren wird die mitochondriale Aktivität der Bronchialepithelzellen durch die beiden CNH-Fractionen ähnlich schwach gehemmt, wobei die CNH-B tendenziell einen stärkeren Effekt bewirken. Dies wird durch die resultierenden EC_{50} -Werte deutlich ($EC_{50}(\text{CNH-A}) = 996 \mu\text{g/mL}$; $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 933 \mu\text{g/mL}$). Die Mitochondrien zeigen auf Grund der ermittelten Werte eine deutliche Beeinträchtigung. Betrachtet man die Auswirkungen der CdSe/CdS-NaSt auf die mitochondriale Aktivität der Bronchialepithelzellen, liegt hier eine mäßige Hemmung mit 46 % vor, wobei die maximale Konzentration hier um 1/3 geringer als bei den CNH-Fractionen lag. Die mitochondriale Aktivität der Alveolarepithelzellen zeigt insgesamt stärkere Hemmungen bedingt durch eine Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt als durch die Exposition mit den beiden CNH-Fractionen auf. Auch hier erzeugt die CNH-B-Fraktion mit breiterem Größenspektrum eine stärkere Hemmung im Vergleich zu der CNH-A-Fraktion: $EC_{50}(\text{CNH-A}) = 671,06 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 501,65 \mu\text{g/mL}$. Aufgrund unterschiedlicher maximaler Konzentrationen der CdSe/CdS-NaSt, bedingt durch Herstellung und weitere Optimierung der angestrebten Probenkonzentrationen, auch in Bezug zu den maximalen Konzentrationen der CNH-Fractionen, lassen die Ergebnisse nur Tendenzen zum Einflussfaktor Größe erkennen. Nur über die mitochondriale Aktivität der Alveolarepithelzellen konnte eine effektive Konzentration der CdSe/CdS-NaSt mit 350 µg/mL ermittelt werden. Dieser Wert der effektiven Konzentration ist der niedrigste, der durch die synthetischen Nanopartikel in den Versuchen dieser Arbeit ermittelt wurde. Somit liegt hier die stärkste Hemmung bedingt durch den kleinsten synthetischen Nanopartikel CdSe/CdS-NaSt vor.

Bereits 2016 bestätigten Schramm et al., dass der zytotoxische Effekt der CNH von der Partikelfraktion und der Zelllinie abhängig ist. Im Konsens zu Schramm et al. (2016) trat im Vergleich der CNH-Fractionen und der Zelltestverfahren ein stärkerer Effekt bei den

Alveolarepithelzellen als bei den Bronchialepithelzellen auf. Des Weiteren besteht Einklang darüber, dass die größere CNH-B-Fraktion in Alveolarepithelzellen zytotoxischere Effekte bewirkt als die kleinere CNH-A-Fraktion (Schramm et al. 2016).

Die CNH-B bewirken hinsichtlich der mitochondrialen Aktivität in Bronchialepithelzellen leicht stärkere Hemmungen als die CNH-A. In diesem Punkt besteht ein Unterschied zu Schramm et al. (2016), die zwar ebenfalls ähnliche Effekte in der Ausprägung der beiden CNH-Fraktionen in Bronchialepithelzellen beobachteten, jedoch einen leicht stärkeren Effekt durch die CNH-A-Fraktion verzeichneten.

Grundsätzlich kann die weit verbreitete Annahme, dass mit abnehmender Partikelgröße die Zytotoxizität zunimmt (Oberdörster et al. 2005) in Bezug auf CNH in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die vorhandenen Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die CNH-B-Fraktion, die in größeren Clustern vorliegt, über die mitochondriale Aktivität in beiden Zelllinien zytotoxischere Effekte anhand von ermittelten EC_{50} -Werten zeigt als die CNH-A-Fraktion. Ein Vergleich mit der Zellvitalität offenbart, dass hier die CNH-B-Fraktion lediglich in einer Zelllinie zytotoxischere Effekte anhand von ermittelten schwachen Hemmungen hat. Die Zellvitalitäten der Bronchialepithelzellen dieser Arbeit zeigen in den Ergebnissen eine stärkere Hemmung bei der CNH-A-Fraktion. Oberdörster et al. (2005) erweiterten bereits 2005 die o. g. getroffene Postulation „Denn nicht nur die Größe, sondern auch viele weitere Partikeleigenschaften bestimmen die biologische Aktivität von Nanopartikeln“ mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform (Oberdörster et al. 2005; Sachverständigenrat für Umweltfragen 2012; Nagy et al. 2013; Ma-Hock et al. 2014; Schramm et al. 2016). Tahara et al. (2012) führten eine geringere Zytotoxizität darauf zurück, dass einzeldispersierte, kleine Agglomerate von modifizierten einwandigen CNH weniger zytotoxisch sind, da diese seltener von Zellen aufgenommen werden und somit intrazellulär in niedrigeren Konzentrationen vorliegen. Die größere CNH-B-Fraktion wirkt bei beiden Zelllinien stärker zytotoxisch als die kleinere CNH-A-Fraktion. Dies kann einerseits an einer intensiveren Wechselwirkung der Zelle mit dem Nanomaterial liegen (Kirchner et al. 2005) und andererseits durch eine unterschiedliche Stoffaufnahme in die Zelle bedingt sein. Zudem wären nach intrazellulärer Aufnahme, und somit bedingter Änderung von Umgebungsbedingungen, ein Zerfall oder eine neue Anordnung der CNH-Agglomerate nicht auszuschließen (Walter 2013).

Betrachtet man das kleinste synthetische Nanomaterial dieser Arbeit, die CdSe/CdS-NaSt, fällt die hohe zytotoxische Wirkung im Vergleich zu den größeren CNH-Fraktionen auf. Betrachtet man die effektiven Konzentrationen, die über die mitochondriale Aktivität in den Alveolarepithelzellen ermittelt wurden, liegt bei den CdSe/CdS-NaSt mit einer effektiven Konzentration von 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ die höchste zytotoxische Wirkung vor, wohingegen die effektiven Konzentrationen von CNH-B um 43 % und von CNH-A um 92 % höher liegen.

4.4 Vergleich der Zelliniensensitivität

4.4.1 Abhängigkeit zu CNH-A/-B

Zur Beurteilung der Sensitivität beider Zelllinien wurde bei den Bronchialepithelzellen in Folge der Exposition mit den beiden CNH-Fractionen bei einer Konzentration von 1000 µg/mL eine Hemmung der Zellvitalität von 11 – 18 % und bei Alveolarepithelzellen von 22 – 27 % festgestellt. Die Zellvitalität der Alveolarepithelzellen wurde durch die CNH damit stärker als die der Bronchialepithelzellen gehemmt.

Beide Zelllinien wurden in Folge der Exposition mit den CNH-Fractionen in ihrer mitochondrialen Aktivität über 50 % gehemmt. Während bei den Bronchialepithelzellen eine 50%ige Hemmung der mitochondrialen Aktivität bei Konzentrationen über 932 µg/mL erreicht wird, genügen fraktionsabhängig 501 – 671 µg/mL für den gleichen Einfluss auf die Alveolarepithelzellen. Die mitochondriale Aktivität der Alveolarepithelzellen wird deutlich sensibler durch eine Exposition mit CNH beeinflusst als die der Bronchialepithelzellen.

Abschließend lässt sich in der Gegenüberstellung beider Zelllinien aus meiner Arbeit feststellen, dass Bronchialepithelzellen robuster gegen Einwirkungen der CNH sind als Alveolarepithelzellen, die in beiden Zytotoxizitätstests sensibler reagieren. Dieses Ergebnis steht im Konsens zu Schramm et al. (2016). Auch Li et al. (2018) und Zhang et al. (2014), deren Forschungen zeigten, dass einwandige CNH mit Zellen unterschiedlicher Gewebe nicht analog interagieren, unterstützen hiermit die Ergebnisse dieser Arbeit.

4.4.2 Abhängigkeit zu CdSe/CdS-NaSt

Zur Bewertung der Sensitivität beider Zelllinien wurden Bronchial- und Alveolarepithelzellen im Anschluss an die Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt in ihren Hemmungen verglichen. Bei maximaler Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 481,5 µg/mL konnte bei Bronchialepithelzellen keine Hemmung der Zellvitalität festgestellt werden. Hingegen zeigten Alveolarepithelzellen bei einer vergleichbaren Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 486,5 µg/mL eine Hemmung von 51 %. Die Zellvitalität der Alveolarepithelzellen wurde durch die CdSe/CdS-NaSt damit deutlich stärker als die der Bronchialepithelzellen gehemmt.

Bei einer mittleren CdSe/CdS-NaSt-Konzentration von 324,0 µg/mL wird die mitochondriale Aktivität der Bronchialepithelzellen bis zu 21 % gehemmt. In den Alveolarepithelzellen werden Hemmungen mit bis zu 31 % bereits bei weniger als der halben Konzentration mit 123,85 µg/mL erreicht. Betrachtet man die mitochondriale Aktivität der Bronchialepithelzellen wurde bei der maximalen Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 681,0 µg/mL eine Hemmung

von 40 % festgestellt. Während Alveolarepithelzellen bei einer geringeren maximalen Konzentration der CdSe/CdS-NaSt von 495,37 µg/mL eine Hemmung von 52 % der mitochondrialen Aktivität zeigten. Dies verdeutlicht, dass die mitochondriale Aktivität der Alveolarepithelzellen deutlich sensibler durch eine Exposition mit CdSe/CdS-NaSt beeinflusst wird als die der Bronchialepithelzellen.

Letztlich demonstriert die Gegenüberstellung der Zelllinien in den beiden Zytotoxizitätstests dieser Arbeit deutlich, dass Bronchialepithelzellen robuster gegen Einwirkungen der CdSe/CdS-NaSt sind als die Alveolarepithelzellen, die deutlich sensibler reagieren.

4.4.3 Abhängigkeit zu Zelllinieneigenschaften

Der Transport der Nanopartikel durch die Doppellipidschicht der Zellmembran ins Zellinnere erfolgt zum Teil durch Diffusion passiv und vor allem durch Endozytose (Dawson et al. 2009; Ohta et al. 2012; Nagy et al. 2013; Peng et al. 2013; He et al. 2018). Unter der Betrachtung des zeitlichen Aspektes konnte in Vorversuchen festgestellt werden, dass Bronchialepithelzellen innerhalb von 24 Stunden quantitativ weniger proliferieren als Alveolarepithelzellen. Die Expositionsdauer von 24 Stunden mit den Suspensionen der synthetischen Nanopartikel war für beide Zelllinien gleich lang gewählt. Daher sollten Bronchialepithelzellen quantitativ weniger Nanopartikel aufgrund eines trägeren Stoffwechsels durch Endozytose aufgenommen haben und somit geringere Hemmungen aufweisen als Alveolarepithelzellen. Der WST-1-Test bestärkt diese Vermutung.

Die in den Versuchen stärker gehemmten Alveolarepithelzellen sind in der Alveolarregion lokalisiert und Bronchialepithelzellen in den Bronchiolen und Alveolen. Zusätzlich zu dem rascheren Zellstoffwechsel (siehe 3.1.3.2) und der Typ-2-Alveolarepithelzeleigenschaften mit Surfactantproduktion (Lieber et al. 1976; Lüllmann-Rauch 2006, S. 336 ff.), besitzen Alveolarepithelzellen eine vergrößerte Zelloberfläche durch Microvilli und dadurch eine erhöhte Resorptionsfähigkeit (Lüllmann-Rauch 2006, S. 336 ff.). Surfactant hat einen amphiphilen Charakter und eine hohe Rezirkulationsrate (Benninghoff und Drenckhahn 2003, S. 574 f.). Ob Surfactant ein Trägermedium bietet oder die weiteren Faktoren eine quantitativ höhere Aufnahme von Nanopartikeln in die Zellen bedingen, ist zu überprüfen.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet zukünftigen Forschungen Ansatzpunkte für eine Untersuchung der synthetischen Nanomaterialien CNH und CdSe/CdS-NaSt. Dabei gilt es die in den *In-vitro*-Untersuchungen ermittelten Zytotoxizitäten zu vertiefen.

So sollten in weiteren Experimenten die genauen Eintrittswege der Nanomaterialien in die Zelle untersuchen werden, sowie deren intrazellulärer Verbleib: Gibt es Strukturen u. a. Kanäle oder Rezeptoren, die den intrazellulären Eintritt der Nanomaterialien erleichtern? Spielt die Größe

des Nanomaterials dabei eine Rolle? Hierzu sollten die synthetischen Nanomaterialien mit unterschiedlich fluoreszierenden Liganden markiert werden. Mittels konfokaler Mikroskopie könnte der fluoreszierende Ligand und zudem der rot fluoreszierende Kern des Nanostäbchenkomplexes dargestellt werden. Ergänzend könnte über die Transmissionselektronenmikroskopie ein möglicher Zerfall der CNH-Agglomerate bzw. der CdSe/CdS-NaSt-Liganden-Komplexe im biologischen Milieu der Zelle detaillierter untersucht werden. Spielt hierbei die 24-stündige Expositionszeit eine Rolle? Dabei ist das Verfahren des *Dynamic-Light-Scattering* für gezielte Größenuntersuchung der Agglomerate anzuwenden, um die tatsächliche Größe der CdSe/CdS-NaSt-Agglomerate und die der CNH-Agglomerate zu ermitteln. Kommt es bei den CdSe/CdS-NaSt, wie in anderen Arbeiten beschrieben, zur Freisetzung von schwermetallhaltigen Cadmiumionen? Inwiefern beeinflussen die membrangebundenen Liganden MPA und MeOH die Zytotoxizität? Haben die Lösungsvermittler, membrangebundene Liganden oder DMSO, eine beeinflussende Wirkung auf die Zytotoxizität? Hierzu sollten die Nanostäbchen in einem weiteren Schritt mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen bestückt werden. Sowohl die Länge der funktionellen Gruppe als auch deren Ladung sollte in der Auswertung berücksichtigt werden. Eine weitere Einflussgröße auf die zytotoxische Wirkung der Nanopartikel dieser Arbeit könnte durch die Eigenschaften der Zelllinie als Tumorzelllinie bedingt sein. Auch eine Beteiligung anderer nicht-tumoröser Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Forschung.

Zukünftige Arbeiten könnten die *In-vitro*-Langzeitwirkung durch eine sukzessive Steigerung der Expositionszeit der synthetischen Nanomaterialien auf die Zellvitalität im Neutralrottest untersuchen. Nagy et al. (2013) und Rainò et al. (2011) postulieren weiterhin, dass zytotoxische Tests immer durch genotoxische Untersuchungen vervollständigt werden müssen und so eine zytotoxische Risikobeurteilung erst aussagekräftig wird.

5 Zusammenfassung

Mit steigender Produktionsvielfalt und -menge von synthetischen Nanopartikeln steigt die Möglichkeit, diese u. a. als freie und luftgetragene Schadstoffe inhalativ aufzunehmen. Diese Arbeit untersuchte Auswirkungen von synthetischen Nanomaterialien (CNH-A, CNH-B und CdSe/CdS-NaSt) auf die menschliche Lungentumorzelllinien NCI-H322 als Bronchialepithelzellen und A-549 als Alveolarepithelzellen mit der Absicht, weitere Beiträge zum komplexen Risikoprofil dieser Stoffe zu liefern. Anhand des Neutralrottests, der eine Unversehrtheit der lysosomalen Membran und der Zellmembran untersucht, und des WST-1-Tests, der eine enzymatisch-intakte mitochondriale Atmungskette prüft, wurde die Zytotoxizität begutachtet.

Ein Kernresultat dieser Arbeit ist, dass alle hier getesteten synthetischen Nanomaterialien eine konzentrationsabhängige Hemmung der mitochondrialen Aktivität beider Zelllinien bewirken. Hierbei haben die Alveolarepithelzellen besonders empfindlich auf eine Exposition mit den Nanopartikeln reagiert. Eine geringe Größe scheint dabei nicht allein ausschlaggebend für eine Zunahme der Hemmung zu sein. So wirkte in der mitochondrialen Aktivität die größere CNH-B-Fraktion zelllinienbedingt stärker zytotoxisch als die kleinere CNH-A-Fraktion. Für beide CNH-Größenfraktionen wurden effektive Konzentrationen in den Zelllinien ermittelt; Bronchialepithelzellen: $EC_{50}(\text{CNH-A}) = 995,65 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 932,50 \mu\text{g/mL}$ und Alveolarepithelzellen: $EC_{50}(\text{CNH-A}) = 671,06 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50}(\text{CNH-B}) = 501,65 \mu\text{g/mL}$.

Die CdSe/CdS-NaSt, das kleinste in dieser Arbeit untersuchte synthetische Nanomaterial, wirkten am stärksten zytotoxisch. Die Zytotoxizitätstests zeigten bei der Zellvitalität in Alveolarepithelzellen und bei der mitochondrialen Aktivität in beiden Zelllinien konzentrationsabhängige Hemmungen der CdSe/CdS-NaSt größer als $100 \mu\text{g/mL}$. Die niedrigste effektive Konzentration dieser Arbeit von $341,33 \mu\text{g/mL}$, die eine 50%-ige Hemmung und somit den stärksten Grad der Hemmung bewirkt, konnte durch CdSe/CdS-NaSt im Zytotoxizitätstest zur mitochondrialen Aktivität in Alveolarepithelzellen ermittelt werden.

Insgesamt zeigen Alveolarepithelzellen stärkere Hemmungen im Vergleich zu Bronchialepithelzellen bedingt durch eine Exposition mit den CdSe/CdS-NaSt als durch die Exposition mit den beiden CNH-Fraktionen, wobei Größenunterschiede innerhalb derselben Stoffklasse der CNH zu verzeichnen sind. Auf Grund dieser Ergebnislage beider Zytotoxizitätstests sind Bronchialepithelzellen robuster als Alveolarepithelzellen. Dies wird besonders deutlich anhand des Zytotoxizitätstest zur mitochondrialen Aktivität. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass beide Zelllinien in Folge der Exposition mit den synthetischen Nanomaterialien geringere Hemmungen in ihrer durch den Neutralrottest ermittelten Zellvitalität zeigten, als die im WST-1-Test ermittelte mitochondriale Aktivität ergab. Die mitochondriale Aktivität liefert einen empfindlicheren Marker zur Feststellung einer konzentrationsabhängigen Zytotoxizität.

6 Anhang

Durchgestrichene Werte wurden als Ausreißer betrachtet und für weitere Betrachtungen (Dosis-Wirkungskurven, EC₅₀-Wert) nicht verwendet.

Im Anhang finden sich bei den Neutralrotttests die MW der prozentualen Zellvitalität [%] oder bei den WST-1-Tests die MW der prozentualen mitochondrialen Aktivität [%] mit Standardabweichung [%]. Zudem wurde für jede Probenkonzentrationen das jeweilige Minimum (Min) und Maximum (Max) abgebildet.

Die Ergebnisse beruhen auf aufgearbeiteten und bereinigten Differenzdaten der Messergebnisse aus den unabhängigen Testreihen. Der MW entspricht dem statistischen Durchschnittswert und wurde aus der Summe aller Messwerte einer Probenkonzentration gebildet, die durch die Anzahl der Messwerte geteilt wurde (2.2.2.5).

Der Bereinigungswert wurde beim WST-1-Test durch den errechneten MW aus den Leerwerten (NK-Medium ohne Zellen) und beim Neutralrotttest aus den Werten der Positivkontrollen (PK) gebildet. Als individueller Referenzwert mit einer Zellvitalität bzw. mitochondrialen Aktivität von 100 Prozent wurde die Negativkontrolle mit 0,75-%-DMSO-Lösung bei den CNH und die NK-pH bei den CdSe/CdS-NaSt genutzt. Hierbei handelte es sich ebenfalls um den jeweiligen MW. Die abgebildete Standardabweichung bezieht sich hierbei jeweils auf die Anzahl der Replikate der Probenkonzentration.

Es wurde in allen Testreihen angestrebt, diese zur Reproduzierbarkeit dreimal zu wiederholen. Da es sich bei den Probenmaterialien CNH-A/-B und CdSe/CdS-NaSt um innovatives Material handelt, standen diese nur in beschränkten Mengen zur Verfügung. Daher war es nicht in allen Fällen möglich, alle gewünschten Wiederholungen durchzuführen.

6.1 Vorversuche

6.1.1 DMSO

Tabelle A.1: Zelllinie NCI-H322 mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (24h), Versuchsdatum: 2013-09-12 und 2014-02-13

Versuchsdatum	2013-09-12	2013-09-12	2014-02-13	2014-02-13
DMSO-Konzentration [% (v/v)]	0	1	0,75	0
Min Zellvitalität [%]	88,36	76,61	110,49	87,74
Max Zellvitalität [%]	106,79	98,46	125,03	106,70
MW Zellvitalität [%]	100,00	86,06	115,80	100,00
Standardabweichung [%]	6,30	7,56	5,13	6,42

Tabelle A.2: Zelllinie A-549 mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (4h), Versuchsdatum: 2013-09-24

DMSO-Konzentration [% (v/v)]	0	1	0,75	0,50
Min Zellvitalität [%]	91,78	99,18	93,42	95,89
Max Zellvitalität [%]	111,51	124,67	109,87	119,73
MW Zellvitalität [%]	100,00	112,85	99,28	103,29
Standardabweichung [%]	7,02	9,18	5,34	7,33

6.1.2 pH-Wert

Tabelle A.3: Daten für Vergleich der optischen Dichte von NK und NK-pH bei der Zelllinie NCI-H322 im Neutralrottest

Versuchsbezeichnung	Versuchsdatum	Optische Dichte			
		NK-pH	NK-pH-Stdabw.	NK	NK-Stdabw.
1	2013-09-12	0,24480	0,00534	0,23680	0,01593
2	2013-09-19	0,19050	0,01596	0,19700	0,02982
3	2013-11-28	0,18520	0,01115	0,18040	0,00700

Tabelle A.4: Daten für Vergleich der optischen Dichte von NK und NK-pH bei der Zelllinie NCI-H322 im WST-1-Test

Versuchsbezeichnung	Versuchsdatum	Optische Dichte			
		NK-pH	NK-pH-Stdabw.	NK	NK-Stdabw.
1	2013-11-21	2,41820	0,05607	2,67680	0,11980
2	2013-12-05	2,02220	0,14460	2,36580	0,14582
3	2014-01-09	2,55220	0,05448	2,43300	0,18803

Tabelle A.5: Daten für Vergleich der optischen Dichte von NK und NK-pH bei der Zelllinie A-549 im Neutralrottest

Versuchsbezeichnung	Versuchsdatum	Optische Dichte			
		NK-pH	NK-pH-Stdabw.	NK	NK-Stdabw.
1	2013-09-24	0,15350	0,01170	0,12975	0,00895
2	2013-11-27	0,12440	0,00822	0,15800	0,00851
3	2014-01-08	0,14160	0,00709	0,15880	0,00991

Tabelle A.6: Daten für Vergleich der optischen Dichte von NK und NK-pH bei der Zelllinie A-549 im WST-1-Test

Versuchsbezeichnung	Versuchsdatum	Optische Dichte			
		NK-pH	NK-pH-Stdabw.	NK	NK-Stdabw.
1	2013-10-09	1,69820	0,11972	2,13620	0,04145
2	2013-11-20	1,81000	0,16705	2,15820	0,17494
3	2013-12-04	1,60600	0,06548	1,68140	0,07663

6.1.3 Wachstumskurve NCI-H322

Tabelle A.7: Ermittlung der Zellkonzentrationen [10^4 Zellen/mL] für eine Wachstumskurve von NCI-H322 vom 2013-10-21

Zeit [h]	0	21,5	45,5	69,5	93,5
Trypsinierungsdauer [min]	22	12	17	17	40
1. Auszählung		64	116	192	274
2. Auszählung	21	66	85	202	273
3. Auszählung		75	96	205	301
4. Auszählung		88	103	220	284
MW	21	73,25	100	204,75	283
Standardabweichung	-	10,94	12,99	11,59	12,99

6.1.4 Wachstumskurve A-549

Tabelle A.8: Ermittlung der Zellkonzentrationen [10^4 Zellen/mL] für eine Wachstumskurve von A-549 vom 2014-04-03

Zeit [h]	0	20	24,583	28,167	44	48
Trypsinierungsdauer [min]		39	39	40	40	40
1. Auszählung: Zellkonzentration		70	130	117	172	237
2. Auszählung: Zellkonzentration	32	73	140	146	238	227
3. Auszählung: Zellkonzentration		72	120	148	238	211
MW	32	71,67	130	137	216	225
Standardabweichung	-	1,53	10	17,35	38,11	13,11

6.1.5 CdSe/CdS-NaSt-Liganden

6.1.5.1 Ligand MPA

6.1.5.1.1 NCI-H322

Tabelle A.9: Ergebnisse Zelllinie NCI-H322 mit Ligand MPA im Neutralrottest vom 2014-06-20

MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	11,92	23,84	46,68	95,35
Min Zellvitalität [%]	108,97	108,03	114,64	103,78
Max Zellvitalität [%]	114,64	110,86	120,30	112,28
MW Zellvitalität [%]	111,33	109,09	117,00	108,69
Standardabweichung [%]	2,39	1,17	1,89	3,35

Tabelle A.10: Ergebnisse Zelllinie NCI-H322 mit Ligand MPA im WST-1-Test vom 2014-05-07

MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	15,00	30,00	60,00	119,90
Min mitochondriale Aktivität [%]	100,38	99,55	97,33	83,68
Max mitochondriale Aktivität [%]	104,51	103,99	100,52	87,01
MW mitochondriale Aktivität [%]	102,61	101,56	98,43	85,88
Standardabweichung [%]	1,48	1,55	1,25	1,29

6.1.5.1.2 A-549

Tabelle A.11: Ergebnisse Zelllinie A-549 mit Ligand MPA im Neutralrottest vom 2014-06-19

MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10,36	20,73	41,45	82,90
Min Zellvitalität [%]	96,75	98,69	90,96	91,73
Max Zellvitalität [%]	101,78	101,78	96,75	94,05
MW Zellvitalität [%]	98,99	99,66	94,05	92,60
Standardabweichung [%]	2,45	1,46	2,10	1,02

Tabelle A.12: Ergebnisse Zelllinie A-549 mit Ligand MPA im WST-1-Test vom 2014-05-07

MPA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	14,60	29,20	58,50	116,90
Min mitochondriale Aktivität [%]	100,30	99,45	92,44	72,89
Max mitochondriale Aktivität [%]	104,65	103,41	98,07	75,26
MW mitochondriale Aktivität [%]	103,01	101,20	94,85	74,02
Standardabweichung [%]	1,93	1,43	2,12	0,84

6.1.5.2 Ligand MeOH

6.1.5.2.1 NCI-H322

Tabelle A.13: Ergebnisse MeOH NCI-H322 NR vom 2014-06-20

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min Zellvitalität [%]	103,78	95,28	100,00	106,14
Max Zellvitalität [%]	108,97	117,94	110,86	113,22
MW Zellvitalität [%]	106,38	107,27	106,05	109,82
Standardabweichung [%]	2,60	9,36	4,06	2,49

Tabelle A.14: Ergebnisse MeOH NCI-H322 WST-1-Test vom 2014-04-17

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min mitochondriale Aktivität [%]	99,16	90,15	100,92	70,65
Max mitochondriale Aktivität [%]	100,40	98,64	108,48	84,15
MW mitochondriale Aktivität [%]	99,64	95,00	104,08	77,07
Standardabweichung [%]	0,48	3,56	2,74	5,52

Tabelle A.15: Ergebnisse MeOH NCI-H322 WST-1-Test vom 2014-05-07

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min mitochondriale Aktivität [%]	108,02	108,37	104,65	77,88
Max mitochondriale Aktivität [%]	112,40	116,77	119,10	83,58
MW mitochondriale Aktivität [%]	110,50	112,01	111,05	80,98
Standardabweichung [%]	1,57	3,08	5,75	2,19

6.1.5.2.2 A-549

Tabelle A.16: Ergebnisse Zelllinie A-549 mit Ligand MeOH im Neutralrottest vom 2014-06-19

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min Zellvitalität [%]	99,85	104,10	104,87	96,75
Max Zellvitalität [%]	103,71	107,19	114,14	102,16
Mittlere Zellvitalität [%]	101,47	105,88	109,42	99,27
Standardabweichung [%]	1,51	1,38	3,51	2,24

Tabelle A.17: Ergebnisse Zelllinie A-549 mit Ligand MeOH im WST-1-Test vom 2014-04-16

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min mitochondriale Aktivität [%]	104,85	105,74	95,32	72,06
Max mitochondriale Aktivität [%]	108,72	110,08	105,50	88,72
MW mitochondriale Aktivität [%]	106,08	108,18	100,42	81,00
Standardabweichung [%]	1,78	1,95	4,29	7,69

Tabelle A.18: Ergebnisse Zelllinie A-549 mit Ligand MeOH im WST-1-Test vom 2014-05-07

MeOH-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	35	70	140	280
Min mitochondriale Aktivität [%]	95,20	95,23	92,36	73,81
Max mitochondriale Aktivität [%]	103,48	101,54	94,88	77,24
MW mitochondriale Aktivität [%]	99,47	98,20	93,68	75,32
Standardabweichung [%]	3,08	2,87	0,94	1,16

6.2 CNH-A

6.2.1 Neutralrottest

6.2.1.1 NCI-H322

Tabelle A.19: 2014-02-13 CNH-A NCI-H322 Neutralrottest

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	78,49	89,41	89,41	81,22	75,76	82,86	77,95	74,13
Max Zellvitalität [%]	91,05	94,32	98,69	88,32	93,78	90,50	94,87	86,14
MW Zellvitalität [%]	86,14	91,38	93,01	84,61	87,66	87,55	88,43	80,35
Standardabweichung [%]	4,74	1,95	4,71	2,71	7,34	3,40	6,88	4,78

Tabelle A.20: 2014-03-20 CNH-A NCI-H322 Neutralrottest

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	88,38	93,09	85,24	86,81	80,53	78,96	92,31	79,75
Max Zellvitalität [%]	98,59	103,30	93,88	92,31	90,74	97,02	97,80	92,31
MW Zellvitalität [%]	91,99	96,23	88,38	89,95	85,24	88,23	93,72	83,99
Standardabweichung [%]	4,18	4,12	4,04	2,42	4,04	7,09	2,32	5,19

6.2.1.2 A-549

Tabelle A.21: 2014-02-12 CNH-A A-549 Neutralrottest

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	99,05	99,05	93,10	85,95	76,43	78,81	78,81	72,86
Max Zellvitalität [%]	101,43	109,76	102,62	105,00	95,48	97,86	90,71	82,38
MW Zellvitalität [%]	100,48	102,62	96,91	95,48	87,62	91,43	85,95	77,14
Standardabweichung [%]	1,00	4,37	3,51	7,09	7,88	7,79	4,53	4,34

Tabelle A.22: 2014-03-12 CNH-A A-549 Neutralrottest

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	91,82	92,63	96,70	91,82	88,84	86,67	81,53	72,05
Max Zellvitalität [%]	105,09	102,93	101,03	100,49	101,03	101,84	89,65	83,97
MW Zellvitalität [%]	96,80	98,97	99,19	97,18	96,05	91,33	86,62	78,17
Standardabweichung [%]	4,95	3,83	1,56	3,35	4,83	6,30	3,56	4,57

6.2.2 WST-1-Test

6.2.2.1 NCI-H322

Tabelle A.23: 2014-02-13 CNH-A NCI-H322 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	80,20	93,20	86,32	89,46	84,46	70,57	58,13	41,06
Max mitochondriale Aktivität [%]	101,11	102,01	97,90	104,51	90,02	77,51	74,15	57,01
MW mitochondriale Aktivität [%]	93,58	97,83	94,21	95,67	87,19	74,66	63,14	48,96
Standardabweichung [%]	8,36	3,21	4,61	6,00	2,25	3,16	6,93	6,63

Tabelle A.24: 2014-02-20 CNH-A NCI-H322 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	98,48	95,48	90,15	87,54	82,10	77,56	57,64	36,34
Max mitochondriale Aktivität [%]	104,26	103,05	101,64	96,52	90,05	88,40	73,91	44,84
MW mitochondriale Aktivität [%]	102,08	99,69	95,69	91,39	85,33	84,28	64,49	39,65
Standardabweichung [%]	2,44	2,88	4,52	4,28	3,34	4,18	6,72	3,31

Tabelle A.25: 2014-02-27 CNH-A NCI-H322 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	87,19	81,39	75,84	71,80	58,65	51,98	42,54	35,00
Max mitochondriale Aktivität [%]	103,72	91,56	78,86	83,54	74,09	63,60	52,56	40,25
MW mitochondriale Aktivität [%]	96,04	84,68	77,58	75,65	66,50	57,44	46,71	36,94
Standardabweichung [%]	6,36	4,06	1,38	4,68	5,70	4,58	3,72	2,16

6.2.2.2 A-549

Tabelle A.26: 2014-02-12 CNH-A A-549 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	99,87	99,22	88,60	75,91	64,10	49,46	44,80	39,02
Max mitochondriale Aktivität [%]	125,07	113,68	101,11	93,55	73,96	70,53	54,72	43,86
MW mitochondriale Aktivität [%]	111,72	106,58	95,07	84,09	69,21	59,60	48,51	40,93
Standardabweichung [%]	9,61	6,33	5,14	7,63	4,41	8,79	4,35	1,96

Tabelle A.27: 2014-02-19 CNH-A A-549 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	112,73	105,14	101,14	81,19	71,68	56,72	43,73	37,24
Max mitochondriale Aktivität [%]	121,89	115,40	110,24	96,96	86,12	70,35	58,46	49,76
MW mitochondriale Aktivität [%]	117,24	109,58	105,43	87,54	77,36	65,18	50,36	44,07
Standardabweichung [%]	3,64	3,85	3,32	5,95	6,61	5,35	5,78	4,60

Tabelle A.28: 2014-02-26 CNH-A A-549 WST-1-Test

CNH-A-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	84,82	84,93	88,86	80,34	61,05	26,12	32,53	25,46
Max mitochondriale Aktivität [%]	118,37	113,84	103,67	104,22	82,22	69,46	55,58	41,54
MW mitochondriale Aktivität [%]	101,98	102,69	97,88	95,67	70,41	46,86	44,09	34,82
Standardabweichung [%]	14,80	14,29	7,00	9,25	9,65	17,16	8,99	6,30

6.3 CNH-B

6.3.1 Neutralrottest

6.3.1.1 NCI-H322

Tabelle A.29: 2014-03-13 CNH-B NCI-H322 Neutralrottest

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	85,48	93,27	93,76	97,66	90,35	95,71	99,12	89,86
Max Zellvitalität [%]	93,27	97,17	98,64	101,56	103,51	105,95	103,02	104,48
MW Zellvitalität [%]	89,67	95,81	96,59	99,42	95,42	99,71	101,07	98,15
Standardabweichung [%]	3,09	1,74	2,05	1,64	4,98	3,77	1,86	5,26

Tabelle A.30: 2014-03-20 CNH-B NCI-H322 Neutralrottest

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	93,64	94,42	95,97	94,42	92,09	94,42	97,52	95,19
Max Zellvitalität [%]	102,17	99,07	106,82	104,50	100,62	104,50	107,60	102,17
MW Zellvitalität [%]	96,12	96,43	100,00	99,53	96,59	99,07	102,64	98,45
Standardabweichung [%]	3,48	1,70	4,15	3,62	3,93	4,25	4,20	2,54

Tabelle A.31: 2014-04-03 CNH-B NCI-H322 Neutralrottest

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	89,59	94,11	90,44	85,63	89,02	92,42	83,93	57,05
Max Zellvitalität [%]	101,75	101,75	94,96	92,98	94,68	95,81	96,38	86,47
MW Zellvitalität [%]	96,15	98,02	93,21	89,93	91,28	94,00	90,66	71,14
Standardabweichung [%]	4,52	2,79	1,68	3,45	2,22	1,37	4,64	12,81

6.3.1.2 A-549

Tabelle A.32: 2014-03-26 CNH-B A-549 Neutralrottest

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	10	100	200	400	600	800	1000
Min Zellvitalität [%]	88,93	99,84	90,95	89,34	82,07	81,26	81,66	69,55
Max Zellvitalität [%]	98,63	100,65	101,05	95,80	96,20	96,61	93,38	78,84
MW Zellvitalität [%]	94,75	100,24	96,77	92,33	89,66	87,96	86,91	72,70
Standardabweichung [%]	3,55	0,29	3,75	2,64	5,79	6,67	4,36	3,61

6.3.2 WST-1-Test

6.3.2.1 NCI-H322

Tabelle A.33: 2013-10-09 CNH-B NCI-H322 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	72,51	65,70	68,35	56,60	31,74	36,78	27,83
Max mitochondriale Aktivität [%]	103,58	81,32	81,27	77,01	49,02	58,80	32,72
MW mitochondriale Aktivität [%]	88,91	75,54	75,64	67,03	43,53	44,81	30,16
Standardabweichung [%]	13,03	6,80	6,03	7,87	7,17	9,84	1,91

Tabelle A.34: 2013-11-21 CNH-B NCI-H322 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	93,83	90,87	83,13	87,02	76,04	62,66	44,12
Max mitochondriale Aktivität [%]	118,23	101,48	98,00	98,40	89,06	69,71	51,09
MW mitochondriale Aktivität [%]	107,98	97,64	88,95	92,44	84,00	66,12	48,16
Standardabweichung [%]	9,53	4,25	6,19	4,12	6,02	2,52	2,71

Tabelle A.35: 2013-12-05 CNH-B NCI-H322 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	68,36	82,08	82,74	74,52	59,70	48,60	35,48
Max mitochondriale Aktivität [%]	107,13	97,04	100,14	90,87	76,44	54,28	50,26
MW mitochondriale Aktivität [%]	88,59	92,11	91,33	83,55	67,54	51,15	44,99
Standardabweichung [%]	10,71	6,20	6,48	7,62	7,11	2,12	6,01

6.3.2.2 A-549

Tabelle A.36: 2013-10-09 CNH-B A-549 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	95,62	88,69	79,43	63,76	52,06	40,70	32,12
Max mitochondriale Aktivität [%]	105,33	116,00	90,96	74,60	58,30	56,43	45,52
MW mitochondriale Aktivität [%]	99,41	103,51	83,92	68,71	55,91	47,18	38,04
Standardabweichung [%]	4,32	12,19	4,36	4,52	2,52	7,18	4,93

Tabelle A.37: 2013-11-20 CNH-B A-549 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	96,46	84,74	69,41	49,81	28,16	30,66	21,13
Max mitochondriale Aktivität [%]	121,87	99,87	77,82	53,27	43,80	38,25	32,13
MW mitochondriale Aktivität [%]	107,67	91,39	74,44	51,48	36,80	32,64	26,33
Standardabweichung [%]	8,39	6,65	4,44	1,42	6,38	3,20	4,32

Tabelle A.38: 2014-02-05 CNH-B A-549 WST-1-Test

CNH-B-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10	100	200	400	600	800	1000
Min mitochondriale Aktivität [%]	91,56	80,84	72,26	47,90	41,57	23,85	22,26
Max mitochondriale Aktivität [%]	111,11	101,73	96,19	64,64	69,76	33,71	43,39
MW mitochondriale Aktivität [%]	102,68	89,32	87,85	55,00	54,85	29,40	28,74
Standardabweichung [%]	8,08	8,86	9,20	6,16	10,33	3,91	8,55

6.4 CdSe/CdS-NaSt

6.4.1 Neutralrottest

6.4.1.1 NCI-H322

Tabelle A.39: 2013-09-12 2,5 g/L CdSe/CdS-NaSt NCI-H322 Neutralrottest

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,09	0,44	0,62	0,89	4,43	17,7	30,98	44,26
Min Zellvitalität [%]	79,66	76,39	84,97	77,21	89,87	87,83	89,46	78,43
Max Zellvitalität [%]	90,69	89,46	96,00	93,95	98,04	104,98	103,35	85,78
MW Zellvitalität [%]	86,36	83,25	89,71	87,99	92,97	93,71	95,02	82,92
Standardabweichung [%]	4,30	5,01	4,03	7,40	3,08	6,67	5,21	2,83

Tabelle A.40: 2013-11-28 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt NCI-H322 Neutralrottest

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,96	9,63	96,3	192,6	288,9	385,2	481,5
Min Zellvitalität [%]	87,37	86,29	81,43	85,75	85,75	89,52	96,54
Max Zellvitalität [%]	96,00	98,70	94,38	97,08	95,46	105,18	101,40
MW Zellvitalität [%]	92,22	93,52	88,77	90,71	89,25	98,16	98,92
Standardabweichung [%]	3,37	4,84	5,30	4,76	4,26	6,19	2,34

6.4.1.2 A-549

Tabelle A.41: 2013-11-27 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt A-549 Neutralrottest

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,91	9,07	90,7	181,4	272,2	362,9	453,6
Min Zellvitalität [%]	119,61	98,71	68,17	56,91	62,54	56,91	66,56
Max Zellvitalität [%]	133,28	109,97	93,89	85,05	86,66	77,81	90,68
MW Zellvitalität [%]	127,81	102,73	82,15	67,68	72,03	64,15	81,51
Standardabweichung [%]	5,61	4,55	9,90	11,85	10,36	8,28	9,97

Da die beiden untersten Verdünnungsstufen (CdSe/CdS-NaSt-Konzentrationen 0,91 und 9,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$) eine mittlere Zellvitalität von über 100 Prozent zeigten, wurde in allen folgenden unabhängigen Testreihen die unterste Verdünnungskonzentration weggelassen und weitere Verdünnungsstufen durch Abstufung der angestrebten Probenkonzentration überarbeitet, um dadurch nach Möglichkeit einen EC_{50} -Wert herauszukristallisieren.

Tabelle A.42: 2014-01-08 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt A-549 Neutralrottest

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9,8	48,6	97,4	121,7	243,1	340,5	486,5	681,0
Min Zellvitalität [%]	100,99	57,91	41,67	43,79	42,37	50,85	43,79	49,44
Max Zellvitalität [%]	116,53	87,57	65,68	71,33	62,85	67,80	57,91	70,62
MW Zellvitalität [%]	108,33	68,79	52,82	55,79	54,80	58,33	50,85	59,60
Standardabweichung [%]	6,97	13,15	10,03	10,95	8,69	6,41	5,31	9,24

6.4.2 WST-1-Test

6.4.2.1 NCI-H322

Tabelle A.43: 2013-11-21 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt NCI-H322 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	27,88	55,55	115,86	231,5	463,2	648,5
Min mitochondriale Aktivität [%]	75,12	79,75	84,22	81,53	66,98	47,54
Max mitochondriale Aktivität [%]	93,32	97,74	93,48	94,85	74,38	60,81
MW mitochondriale Aktivität [%]	83,67	84,57	88,22	85,81	70,00	53,54
Standardabweichung [%]	6,69	7,66	3,44	5,19	3,23	6,06

Tabelle A.44: 2013-12-05 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt NCI-H322 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9,91	29,72	59,44	99,07
Min mitochondriale Aktivität [%]	82,76	82,32	74,45	75,05
Max mitochondriale Aktivität [%]	115,99	94,18	99,67	84,64
MW mitochondriale Aktivität [%]	96,85	88,2	84,63	79,31
Standardabweichung [%]	13,19	5,67	9,90	4,55

Tabelle A.45: 2014-01-09 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt NCI-H322 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9,3	46,3	92,6	115,7	231,4	324,0	462,9	648,0
Min mitochondriale Aktivität [%]	99,82	94,30	84,97	94,49	85,24	82,97	62,01	56,88
Max mitochondriale Aktivität [%]	109,42	106,25	106,32	102,33	90,18	91,40	80,03	68,32
MW mitochondriale Aktivität [%]	103,15	100,93	95,60	96,53	87,34	88,05	72,61	63,11
Standardabweichung [%]	3,81	4,62	8,20	3,33	2,00	3,56	6,62	4,25

6.4.2.2 A-549

Tabelle A.46: 2013-10-09 2,5 g/L CdSe/CdS-NaSt A-549 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9,0	90,3	225,82	327,0	436,0
Min mitochondriale Aktivität [%]	96,93	66,45	28,60	55,95	31,85
Max mitochondriale Aktivität [%]	108,31	76,27	37,25	65,35	51,53
MW mitochondriale Aktivität [%]	101,66	72,46		61,11	41,45
Standardabweichung [%]	4,20	3,98		4,66	7,48

Tabelle A.47: 2013-11-20 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt A-549 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	49,5	103,0	206,0	412,0
Min mitochondriale Aktivität [%]	85,25	67,13	54,86	37,57
Max mitochondriale Aktivität [%]	111,33	95,64	67,13	52,65
MW mitochondriale Aktivität [%]	98,24	82,57	61,39	44,78
Standardabweichung [%]	11,28	10,98	4,43	5,39

Tabelle A.48: 2013-12-04 4,1 g/L CdSe/CdS-NaSt A-549 WST-1-Test

CdSe/CdS-NaSt-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9,91	29,72	59,45	99,08	123,85	247,69	346,78	495,37
Min mitochondriale Aktivität [%]	86,71	76,44	68,22	64,17	60,06	48,17	37,58	42,13
Max mitochondriale Aktivität [%]	110,62	94,99	83,29	78,56	75,50	62,55	54,08	53,34
MW mitochondriale Aktivität [%]	94,81	83,80	72,27	69,18	69,76	56,30	48,03	48,20
Standardabweichung [%]	10,12	7,09	6,23	6,08	6,07	5,45	6,38	4,53

7 Literaturverzeichnis

- Aaron JS, Greene AC, Kotula PG, Bachand GD, Timlin JA (2011): Advanced optical imaging reveals the dependence of particle geometry on interactions between CdSe quantum dots and immune cells. *Small* **7**, 334–341
- Ajima K, Yudasaka M, Murakami T, Maigné A, Shiba K, Iijima S (2005): Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Mol Pharm* **2**, 475–480
- Ajima K, Murakami T, Mizoguchi Y, Tsuchida K, Ichihashi T, Iijima S, Yudasaka M (2008): Enhancement of in vivo anticancer effects of cisplatin by incorporation inside single-wall carbon nanohorns. *ACS Nano* **2**, 2057–2064
- Allocca M, Mattera L, Bauduin A, Miedziak B, Moros M, De Trizio L, Tino A, Reiss P, Ambrosone A, Tortiglione C (2019): An integrated multilevel analysis profiling biosafety and toxicity induced by indium- and cadmium-based quantum dots in vivo. *Environ Sci Technol* **53**, 3938–3947
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, et al.: *Anatomie (Duale Reihe)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007
- BAuA, VCI: Empfehlung für die Gefährdungsbeurteilung bei Tätigkeiten mit Nanomaterialien am Arbeitsplatz. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Verband der Chemischen Industrie e.V. Wissenschaft, Technik und Umwelt 2012
- Behrends JC, Bischhofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, et al.: *Physiologie (Duale Reihe)*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2010
- Benninghoff A, Drenckhahn D: *Anatomie – Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1; 16. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2003
- Borenfreund E, Puerner JA (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* **24**, 119–124
- Cao Y, Zhang Y, Zhao M (2015): Single-walled carbon nanohorns inhibit proliferation of conjunctival melanoma cell lines CRMM-1 and involved in energy metabolism. *J Nanosci Nanotechnol* **15**, 1821–1830
- Choi J, Zhang Q, Reipa V, Wang NS, Stratmeyer ME, Hitchins VM, Goering PL (2009): Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages. *J Appl Toxicol* **29**, 52–60
- Dawson KA, Salvati A, Lynch I (2009): Nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnology* **4**, 84–85
- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN (2004): Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett* **4**, 11–18
- Deshmukh AB, Shelke MV (2013): Synthesis and electrochemical performance of a single walled carbon nanohorns-Fe₃O₄ nanocomposite supercapacitor electrode. *RSC Adv* **3**, 21390–21393
- Devereux SJ, Cheung S, Daly HC, O’Shea DF, Quinn SJ (2018): Multimodal microscopy distinguishes extracellular aggregation and cellular uptake of single-walled carbon nanohorns. *Chemistry* **24**, 14162–14170

- DSMZ: Datenblatt der Zelllinie A-549. Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. <https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-107.html>; abgerufen am 2019-02-03
- Europäische Kommission (2011): Was ist ein „Nanomaterial“? Europäische Kommission legt erstmals gemeinsame Definition vor. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_de.pdf; abgerufen am 2017-01-07
- Europäische Kommission (2018): Verordnung (EU) 2018/1881 der Kommission vom 3. Dezember 2018 zur Änderung der Anhänge I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI und XII der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) zwecks Berücksichtigung der Nanoformen von Stoffen. Amtsblatt der Europäischen Union
- Ferin J, Oberdörster G (1992): Translocation of particles from pulmonary alveoli into the interstitium. *J Aerosol Med* 5, 179–187
- Gazdar AF, Linnoila RI, Kurita Y, Oie HK, Mulshine JL, Clark JC, Whitsett JA (1990): Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 50, 5481–5487
- Gebel T: Toxikologie von Nanomaterialien. In: Greim H (Hrsg.): *Das Toxikologiebuch*. John Wiley & Sons, Ltd 2017, 805–815
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417–1423
- Grigat A, Lang F, Wilke BM: Nanomaterialien. In: Wilck W, Wilke BM, Litz N (Hrsg.): *Bodengefährdende Stoffe – Bewertung – Stoffdaten – Ökotoxikologie – Sanierung*. John Wiley & Sons, Ltd 2013
- Gstraunthaler G, Lindl T: *Zell- und Gewebekultur – Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2013
- Halter R, Mangelsdorf I: Partikel- und Fasertoxikologie. In: *Das Toxikologiebuch*. John Wiley & Sons, Ltd 2017, 773–804
- He B, Shi Y, Liang Y, Yang A, Fan Z, Yuan L, Zou X, Chang X, Zhang H, Wang X, et al. (2018): Single-walled carbon-nanohorns improve biocompatibility over nanotubes by triggering less protein-initiated pyroptosis and apoptosis in macrophages. *Nat Commun* 9, 2393
- Heinrich U: Animal studies on the effect of nanoparticles in organs other than the lungs. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Hrsg.): *Nanomaterials*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2013, 49–52
- Hiralal P, Wang H, Unalan HE, Liu Y, Rouvala M, Wei D, Andrew P, Amaratunga GAJ (2011): Enhanced supercapacitors from hierarchical carbon nanotube and nanohorn architectures. *J Mater Chem* 21, 17810
- ISO/TS 80004-1: Nanotechnologies – vocabulary – part 1: core terms. International Organization for Standardization 2015
- ISO/TS 80004-2: Nanotechnologies – vocabulary – part 2: nano-objects. International Organization for Standardization 2015
- Karousis N, Suarez-Martinez I, Ewels CP, Tagmatarchis N (2016): Structure, properties, functionalization, and applications of carbon nanohorns. *Chem Rev* 116, 4850–4883

- Kasuya D, Yudasaka M, Takahashi K, Kokai F, Iijima S (2002): Selective production of single-wall carbon nanohorn aggregates and their formation mechanism. *J Phys Chem B* **106**, 4947–4951
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Muñoz Javier A, Gaub HE, Stölzle S, Fertig N, Parak WJ (2005): Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* **5**, 331–338
- Köhler M: Nanotechnologie. In: Dittmeyer R, Keim W, Kreysa G, Oberholz A (Hrsg.): Winnacker/Küchler. *Chemische Technik – Prozesse und Produkte. Band 2: Neue Technologien*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004, 873–898
- Kreyling W, Scheuch G: Clearance of particles deposited in the lungs. In: Gehr P, Heyder J (Hrsg.): *Particle-lung interactions*. Informa UK Limited 2000, 323–376
- Kreyling WG: Toxicokinetics of inhaled nanoparticles. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Hrsg.): *Nanomaterials*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2013, 32–36
- Kreyling WG, Geiser M: Dosimetry of inhaled nanoparticles. In: Marijnissen JCM, Gradoń L (Hrsg.): *Nanoparticles in medicine and environment – inhalation and health effects*. Springer, Dordrecht 2009, 145–171
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL (2004): Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* **77**, 126–134
- Li B, Chen X, Yang W, He J, He K, Xia Z, Zhang J, Xiang G (2018): Single-walled carbon nanohorn aggregates promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in hepatoblastoma cells by targeting SIRT3. *Int J Oncol* **53**, 1129–1137
- Li J, He Y, He Z, Zeng P, Xu S (2012): Synthesis of NaYF₄:Yb,Er/single-walled carbon nanohorns nanocomposite and its application as cells label. *Anal Biochem* **428**, 4–6
- Li KG, Chen JT, Bai SS, Wen X, Song SY, Yu Q, Li J, Wang YQ (2009): Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicol In Vitro* **23**, 1007–1013
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003): Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455–460
- Lieber M, Todaro G, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* **17**, 62–70
- Liu X, Shi L, Niu W, Li H, Xu G (2008): Amperometric glucose biosensor based on single-walled carbon nanohorns. *Biosens Bioelectron* **23**, 1887–1890
- Lodermeyer F, Costa RD, Casillas R, Kohler FTU, Wasserscheid P, Prato M, Guldi DM (2015): Carbon nanohorn-based electrolyte for dye-sensitized solar cells. *Energy Environ Sci* **8**, 241–246
- Loginova YF, Kazachkina NI, Zherdeva VV, Rusanov AL, Shirmanova MV, Zagaynova EV, Sergeeva EA, Dezhurov SV, Wakstein MS, Savitsky AP (2012): Biodistribution of intact fluorescent CdSe/CdS/ZnS quantum dots coated by mercaptopropionic acid after intravenous injection into mice. *J Biophotonics* **5**, 848–859
- Louis KS, Siegel AC: Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: Stoddart MJ (Hrsg.): *Mammalian cell viability – methods and protocols (Methods in molecular biology)*. Band 740; Springer, New York 2011, 7–12

- Lüllmann-Rauch R: Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006
- Ma-Hock L, Farias PMA, Hofmann T, Andrade ACDS, Silva JN, Arnaud TMS, Wohlleben W, Strauss V, Treumann S, Chaves CR, et al. (2014): Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of glutaraldehyde-coated CdS/Cd(OH)₂ core shell quantum dots in rats. *Toxicol Lett* 225, 20–26
- Malvindi MA, Corato RD, Curcio A, Melisi D, Rimoli MG, Tortiglione C, Tino A, George C, Brunetti V, Cingolani R, et al. (2011): Multiple functionalization of fluorescent nanoparticles for specific biolabeling and drug delivery of dopamine. *Nanoscale* 3, 5110
- Michalet X (2005): Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538–544
- Minerva Biolabs GmbH: Venor GeM – mycoplasma detection kit for conventional PCR. Berlin 2012
- Mittmann-Frank M, Berger H, Buchter A (2009): Arbeitsmedizinisches und präventivmedizinisches Untersuchungsprogramm bei Exposition mit Nanopartikeln und speziellen oder neuen Materialien. *Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz Ergon* 59, 336–343
- Miyawaki J, Yudasaka M, Azami T, Kubo Y, Iijima S (2008): Toxicity of single-walled carbon nanohorns. *ACS Nano* 2, 213–226
- Molitor N, Javelle C: New research and application research results with CNH – an overview. http://www.t-i-e.eu/fileadmin/downloads/PRESENTATION_TIE-29Jan2013_%28fin%29EN.pdf; abgerufen am 2017-09-09
- Molitor N, Kitamura T, Javelle C (2013): Status paper – background information on carbon nanohorns (CNH). TIE GmbH, Griesheim. http://www.t-i-e.eu/fileadmin/downloads/Statuspaper_EN_March2013.pdf; abgerufen am 2017-09-05
- Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, Häussinger K, Kreyling WG (2008): Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 426–432
- Möller W, Kreyling WG, Schmid O, Semmler-Behnke M, Schulz H: Deposition, retention and clearance and translocation of inhaled fine and nano-sized particles in the respiratory tract. In: Gehr P, Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Blank F (Hrsg.): *Particle-lung interactions (Lung biology in health and disease)*. 2. Auflage; Informa Healthcare, New York 2009, 79–107
- Mountrichas G, Tagmatarchis N, Pispas S (2009): Functionalization of carbon nanohorns with polyethylene oxide: synthesis and incorporation in a polymer matrix. *J Nanosci Nanotechnol* 2, 3775–3779
- Nagy A, Steinbrück A, Gao J, Doggett N, Hollingsworth JA, Iyer R (2012): Comprehensive analysis of the effects of CdSe quantum dot size, surface charge, and functionalization on primary human lung cells. *ACS Nano* 6, 4748–4762
- Nagy A, Hollingsworth JA, Hu B, Steinbrück A, Stark PC, Rios Valdez C, Vuyisich M, Stewart MH, Atha DH, Nelson BC, Iyer R (2013): Functionalization-dependent induction of cellular survival pathways by CdSe quantum dots in primary normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano* 7, 8397–8411
- Nultsch W: Allgemeine Botanik. 11. Auflage; Thieme, Stuttgart 2001
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994): Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102, 173–179

- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005): Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**, 823–839
- OECD: Test no. 432: in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. In: OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. OECD publishing, Paris 2004
- Ohta S, Inasawa S, Yamaguchi Y (2012): Real time observation and kinetic modeling of the cellular uptake and removal of silicon quantum dots. *Biomaterials* **33**, 4639–4645
- Pagona G, Tagmatarchis N, Fan J, Yudasaka M, Iijima S (2006): Cone-end functionalization of carbon nanohorns. *Chem Mater* **18**, 3918–3920
- Pagona G, Sandanayaka ASD, Maigné A, Fan J, Papavassiliou GC, Petsalakis ID, Steele BR, Yudasaka M, Iijima S, Tagmatarchis N, Ito O (2007): Photoinduced electron transfer on aqueous carbon nanohorn–pyrene–tetrathiafulvalene architectures. *Chemistry* **13**, 7600–7607
- Pagona G, Sandanayaka ASD, Hasobe T, Charalambidis G, Coutsolelos AG, Yudasaka M, Iijima S, Tagmatarchis N (2008): Characterization and photoelectrochemical properties of nanostructured thin film composed of carbon nanohorns covalently functionalized with porphyrins. *J Phys Chem* **112**, 15735–15741
- Peng L, He M, Chen B, Wu Q, Zhang Z, Pang D, Zhu Y, Hu B (2013): Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. *Biomaterials* **34**, 9545–9558
- Quarta A, Ragusa A, Deka S, Tortiglione C, Tino A, Cingolani R, Pellegrino T (2009): Bioconjugation of rod-shaped fluorescent nanocrystals for efficient targeted cell labeling. *Langmuir* **25**, 12614–12622
- Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W (1995): Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol* **269**, L285–L292
- Rainò G, Stöferle T, Moreels I, Gomes R, Kamal JS, Hens Z, Mahrt RF (2011): Probing the wave function delocalization in CdSe/CdS dot-in-rod nanocrystals by time- and temperature-resolved spectroscopy. *ACS Nano* **5**, 4031–4036
- Rikans LE, Yamano T (2000): Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 110–117
- Roberts JR, Antonini JM, Porter DW, Chapman RS, Scabillon JF, Young SH, Schwegler-Berry D, Castranova V, Mercer RR (2013): Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. *Part Fibre Toxicol* **10**, 5
- Sachverständigenrat für Umweltfragen: Vorsorgestrategien für Nanomaterialien Sondergutachten Juni 2011. Erich Schmidt, Berlin 2012
- Salomon M (2009): Gesundheitsrisiken durch synthetische Nanomaterialien. *Umweltmed Forsch Prax* **14**, 7–22
- Sandanayaka ASD, Pagona G, Fan J, Tagmatarchis N, Yudasaka M, Iijima S, Araki Y, Ito O (2007): Photoinduced electron-transfer processes of carbon nanohorns with covalently linked pyrene chromophores: charge-separation and electron-migration systems. *J Mater Chem* **17**, 2540
- Santone KS, Acosta D, Bruckner JV (1982): Cadmium toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* **10**, 169–177

- Schober W, Winterhalter R, Kohlhuber M, Fromme H: Nanomaterialien am Arbeitsplatz - Exposition, gesundheitliche Risiken und Präventionsmaßnahmen (Arbeitsschutz und Produktsicherheit). Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen 2012
- Schramm F, Lange M, Hallier E, Hoppmann P, Heutelbeck A: In-vitro-Untersuchungen von Kohlenstoffnanohorns an humanen nasalen Epithelzellen. In: Hildenbrand S, Rieger MA (Hrsg.): Dokumentationsband zur 55. DGAUM-Jahrestagung. Institut für Arbeitsmedizin, Sozialmedizin und Versorgungsforschung Universitätsklinikum Tübingen 2015, 562–563
- Schramm F, Lange M, Hoppmann P, Heutelbeck A (2016): Cytotoxicity of carbon nanohorns in different human cells of the respiratory system. *J Toxicol Environ Health A* 79, 1085–1093
- Shi L, Liu X, Niu W, Li H, Han S, Chen J, Xu G (2009): Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of soybean peroxidase immobilized on single-walled carbon nanohorn modified electrode. *Biosens Bioelectron* 24, 1159–1163
- Shi Y, Shi Z, Li S, Zhang Y, He B, Peng D, Tian J, Zhao M, Wang X, Zhang Q (2017): The interactions of single-wall carbon nanohorns with polar epithelium. *Int J Nanomed* 12, 4177–4194
- Sigma-Aldrich: NCI-H322 cell line human. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/95111734?lang=de®ion=DE>; abgerufen am 2017-08-28
- Smith BT (1977): Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am Rev Respir Dis* 115, 285–293
- Smith H (Hrsg.): Annals of the ICRP. Band 24; International Commission on Radiological Protection 1994
- Soenen SJ, Abe S, Manshian BB, Aubert T, Hens Z, De Smedt SC, Braeckmans K (2015): The effect of intracellular degradation on cytotoxicity and cell labeling efficacy of inorganic ligand-stabilized colloidal CdSe/CdS quantum dots. *J Biomed Nanotechnol* 11, 631–643
- Tahara Y, Nakamura M, Yang M, Zhang M, Iijima S, Yudasaka M (2012): Lysosomal membrane destabilization induced by high accumulation of single-walled carbon nanohorns in murine macrophage RAW 264.7. *Biomaterials* 33, 2762–2769
- TIE GmbH: Carbon Nanohorns FAQs. <http://www.t-i-e.eu/index.php?id=4>; abgerufen am 2020-05-31
- Tortiglione C, Quarta A, Malvindi MA, Tino A, Pellegrino T (2009): Fluorescent nanocrystals reveal regulated portals of entry into and between the cells of hydra. *PLOS ONE* 4, e7698
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (Hrsg.): WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart (World Health Organization classification of tumours). IARC Press, Lyon 2015
- Tu W, Lei J, Ding L, Ju H (2009): Sandwich nanohybrid of single-walled carbon nanohorns–TiO₂–porphyrin for electrocatalysis and amperometric biosensing towards chloramphenicol. *Chem Commun* 4227–4229
- Valentini F, Ciambella E, Conte V, Sabatini L, Ditaranto N, Cataldo F, Palleschi G, Bonchio M, Giacalone F, Syrgiannis Z, Prato M (2014): Highly selective detection of epinephrine at oxidized single-wall carbon nanohorns modified screen printed electrodes (SPEs). *Biosens Bioelectron* 59, 94–98

- Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A (2006): The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotech* 24, 1211–1217
- Walter D: Primary particles – agglomerates – aggregates. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Hrsg.): *Nanomaterials*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2013, 9–24
- Wegner K, Pratsinis SE: Nanomaterialien. In: Dittmeyer R, Keim W, Kreysa G, Oberholz A (Hrsg.): *Winnacker/Küchler. Chemische Technik – Prozesse und Produkte. Band 2: Neue Technologien*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004, 823–871
- Yang F, Han J, Zhuo Y, Yang Z, Chai Y, Yuan R (2014): Highly sensitive impedimetric immunosensor based on single-walled carbon nanohorns as labels and bienzyme biocatalyzed precipitation as enhancer for cancer biomarker detection. *Biosens Bioelectron* 55, 360–365
- Yang M, Zhang M, Tahara Y, Chechetka S, Miyako E, Iijima S, Yudasaka M (2014): Lysosomal membrane permeabilization: Carbon nanohorn-induced reactive oxygen species generation and toxicity by this neglected mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 280, 117–126
- Yang P, Cao Y, Li X, Zhang R, Liu N, Zhang Y (2014): CdTe_{1-x}Se_x/Cd_{0.5}Zn_{0.5} core/shell quantum dots: core composition and property. *Luminescence* 29, 407–411
- Yang Y, Yang X, Yang Y, Yuan Q (2018): Aptamer-functionalized carbon nanomaterials electrochemical sensors for detecting cancer relevant biomolecules. *Carbon* 129, 380–395
- Yoshitake T, Shimakawa Y, Kuroshima S, Kimura H, Ichihashi T, Kubo Y, Kasuya D, Takahashi K, Kokai F, Yudasaka M, Iijima S (2002): Preparation of fine platinum catalyst supported on single-wall carbon nanohorns for fuel cell application. *Phys B: Condens Matter* 323, 124–126
- Yuge R, Tamura N, Manako T, Nakano K, Nakahara K (2014): High-rate charge/discharge properties of Li-ion battery using carbon-coated composites of graphites, vapor grown carbon fibers, and carbon nanohorns. *J Power Sources* 266, 471–474
- Zacheo A, Quarta A, Mangoni A, Pompa PP, Mastria R, Capogrossi MC, Rinaldi R, Pellegrino T (2011): CdSe/CdS semiconductor quantum rods as robust fluorescent probes for paraffin-embedded tissue imaging. *IEEE Trans Nanobioscience* 10, 209–215
- Zavelani-Rossi M, Lupo MG, Krahne R, Manna L, Lanzani G (2010): Lasing in self-assembled microcavities of CdSe/CdS core/shell colloidal quantum rods. *Nanoscale* 2, 931
- Zhang J, Sun Q, Huang R, Zhang M, Xia Z, Ju L, xiang, Bo J (2014): Single-walled carbon nanohorn (SWNH) aggregates inhibited proliferation of human liver cell lines and promoted apoptosis, especially for hepatoma cell lines. *Int J Nanomed* 759
- Zhang M, Yang M, Bussy C, Iijima S, Kostarelos K, Yudasaka M (2015): Biodegradation of carbon nanohorns in macrophage cells. *Nanoscale* 7, 2834–2840
- Zhang T, Stilwell JL, Gerion D, Ding L, Elboudwarej O, Cooke PA, Gray JW, Alivisatos AP, Chen FF (2006): Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett* 6, 800–808
- Zhang Y, He J, Wang PN, Chen JY, Lu ZJ, Lu DR, Guo J, Wang CC, Yang WL (2006): Time-dependent photoluminescence blue shift of the quantum dots in living cells: effect of oxidation by singlet oxygen. *J Am Chem Soc* 128, 13396–13401

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Astrid Heutelbeck für die Überlassung des Themas, sowie die Betreuung und ihre Unterstützung.

Hiermit bedanke ich mich ebenfalls bei Frau Dr. rer. nat. Franziska Breuer für ihre Betreuung und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Interpretation der Testreihen, sowie für ihre konstruktiven Anregungen und Ratschläge.

Recht herzlich bedanke ich mich bei Frau Pia Hoppmann und Frau Martina Lange für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke des Weiteren allen Mitarbeitern des Instituts für Arbeits-, Sozial-, und Umweltmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. E. Hallier der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für das angenehme Arbeitsklima.